

GASCHROMATOGRAPHISCHER
NACHWEIS
VON BARBITURATEN

GUNDULA OBER

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0019

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Versicherungs-Medizin
der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. W. Spann

GASCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON BARBITURATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
GUNDULA OBER
geboren in Jena

München 1973

Mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Universität München



Berichterstatter: Professor Dr. phil. nat. G. Hauck
Mitberichterstatter: Professor Dr. med. W. Spann
Dekan: Professor Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 5.6.1973

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. phil. nat. Gerhard Hauck, auf dessen Anregung und unter dessen Leitung diese Arbeit entstand, für seine Freundlichkeit, jederzeit Rat erteilt zu haben.

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Spann danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für gerichtliche und Versicherungs-Medizin der Universität München.

Für viele wertvolle Anregungen und Hinweise bei der Arbeit am Gaschromatographen möchte ich Herrn Apotheker Ludwig von Meyer danken.

LEBENS LAUF

Am 19. 6. 1940 wurde ich, Gundula Ober, als Tochter des Regierungsdirektors Josef Ober und seiner Ehefrau Thekla, geb. Huber, in Jena/Thüringen geboren.

1946 zog die Familie nach Höpfling, Landkreis Traunstein/Obb. und 1950 nach Grub bei München. Ich besuchte zunächst vier Jahre die Volksschule Siegsdorf bei Traunstein und dann drei Jahre die Volksschule Kirchheim bei München. Nach Besuch des Deutschen Gymnasiums München-Pasing ab 1953 legte ich 1960 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich das Medizinstudium an der Universität München und bestand dort 1965 die ärztliche Vorprüfung. Während der vorklinischen Zeit studierte ich ein Semester an der Universität Würzburg. Die klinischen Semester studierte ich wiederum an der Universität München und legte dort 1968 das Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich von Januar bis Juli 1969 auf der chirurgischen Abteilung des Gemeindekrankenhauses Oberstdorf/Allgäu und von September 1969 bis Mai 1970 auf der inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Bad Reichenhall.

Nach Erhalt der Approbation im Mai 1970 war ich zwei Jahre in der Psychiatrie im Nervenkrankenhaus Regensburg als Assistenzärztin tätig. Ab Mai 1972 beschäftigte ich mich mit meiner Dissertationsarbeit im Institut für gerichtliche und Versicherungsmedizin der Universität München.

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung

- I. Bedeutung der Barbiturate in der forensischen Toxikologie
- II. Nachweismethoden für Barbiturate
- III. Überblick über die Literatur
 1. Gaschromatographische Untersuchungen
 2. Extraktion aus biologischem Material
 3. Identifizierung und quantitative Bestimmung
- IV. Eigene Problemstellung

B. Experimenteller Teil

- I. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten aus Lösungen der Reinsubstanzen
 1. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten ohne Derivatisierung
 2. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten nach Äthylierung mit Tetraäthylammoniumhydroxid
 3. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten nach Methylierung mit Dimethylsulfat
 4. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen nach Methylierung mit Trimethylaniliniumhydroxid
 5. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen mit langen Retentionszeiten

II. Nachweis von Barbituraten in biologischem Material

1. Ausarbeitung einer Extraktionsmethode
2. Kombination von Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie
3. Andere Arzneistoffe und körpereigene Substanzen, die mit extrahiert und gaschromatographisch erfaßt werden
4. Identifizierung und quantitative Bestimmung
5. Praktische Beispiele

C. Diskussion

D. Zusammenfassung

E. Literaturverzeichnis

4. EINLEITUNG

I. Bedeutung der Barbiturate in der forensischen Toxikologie

Trotz vieler neuer synthetischer Schlafmittel werden die Barbiturate immer noch umfangreich als sedierend-hypnotisch wirkende Arzneimittel zu therapeutischen Zwecken verwendet. Wegen des schnellen Wirkungseintritts und der Toxizität kann es bei dieser Gruppe von Schlafmitteln bei Überdosierung rasch zur tödlichen Vergiftung kommen. Neben akzidentellen spielen in der forensischen Toxikologie besonders suizidale Vergiftungsfälle eine Rolle.

Außer akuten Intoxikationen durch Barbiturate werden in der Rechtsmedizin mit zunehmender Häufigkeit chronischer Barbituratmißbrauch und Barbituratsucht angetroffen.

Barbiturate werden oft in Kombination mit anderen Mitteln, z.B. barbitursäurefreien Sedativa, Analgetica, Opiaten und Psychopharmaca, gebraucht, wobei sich nicht nur eine Summation, sondern auch eine Potenzierung der Wirkung ergeben kann. Diese Gefahr besteht vor allem bei Barbituraten, die eine lange Wirkungsdauer haben. Der potenzierende Effekt in Verbindung mit Alkohol hat besonders in der Verkehrsmedizin Bedeutung.

Da sich dem Gerichtsmediziner aus der Symptomatik und der pathologischen Anatomie meist kein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen einer Barbituratvergiftung bietet, ist der Nachweis dieser Arzneistoffe in biologischem Material von großer Wichtigkeit.

II. Nachweismethoden für Barbiturate

In der Analytik der Barbiturate stehen zahlreiche chemische Methoden zur Verfügung, die jedoch nur dem reinen Gruppennachweis dienen.

Zur Identifizierung von Einzelsubstanzen gibt es physikalische Methoden, die aber hohe Anforderungen an den Reinheitsgrad stellen, z.B. Kristallographie, Bestimmung des Brechungsindex, Schmelzpunktbestimmung und Infrarot-Spektrophotometrie. Auch beim Nachweis von Barbituraten durch UV-Spektrophotometrie sind besondere vorherige Reinigungsverfahren nötig. Es lassen sich bei dieser Methode außerdem nur wenige Aussagen machen, die über den reinen Gruppennachweis hinausgehen.

Dünnschicht- und Gaschromatographie sind Trennungungsverfahren, die sich zur Analyse von Barbituraten in Gemischen von Verbindungen der gleichen Gruppe oder mit anderen Substanzen eignen, ohne daß vorher eine besonders sorgfältige Reinigungsmethode notwendig wäre. Dabei ist die Gaschromatographische Untersuchungstechnik der dünnschichtchromatographischen überlegen, weil sie spezifischer, empfindlicher und schneller ist.

Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, hätte noch höheren Informationswert, steht aber wegen des großen und kostspieligen apparativen Aufwands noch nicht allgemein im chemisch-toxikologischem Labor für Routineanalysen zur Verfügung.

III. Überblick über die Literatur

1. Gaschromatographische Untersuchungen

1960 versuchte Janák (24), Barbiturate durch Erhitzung der Probe auf 800°C mit nachfolgender gaschromatographischer Trennung der Pyrolyseprodukte zu identifizieren. 1962 wurde von Nelson und Kirk (35) ein ähnliches Verfahren beschrieben und die einzelnen Pyrolysemuster von 23 Barbituraten dargestellt. Diese Methoden, die auf der Tatsache beruhen, daß Barbiturate bei höheren Temperaturen zerstört werden, gaben zufriedenstellende Ergebnisse bei Anwesenheit von einem einzigen Barbiturat, waren jedoch bei Barbituratmischungen zur Identifizierung ungeeignet.

Ein entscheidender Fortschritt bei der Gaschromatographie von Barbituraten wurde durch die Einführung von Säulen mit niedrigem Belegungsgrad durch Horning und Mitarbeiter (21) 1960 erreicht. In Verbindung mit empfindlichen Ionisationsdetektoren war nunmehr die Auftrennung einer kleinen Barbituratmenge bei relativ niedriger Temperatur und innerhalb einer kurzen Zeit möglich. Von dieser Idee machten Brochmann-Hanssen und Baerheim (9,10) Gebrauch (1961 und 1962). Sie trennten eine große Zahl von Barbituraten auf mehreren Säulen unterschiedlicher Polarität. Bei einer Temperatur von 150°C wurden z.B. 12 gebräuchliche Barbiturate auf einer Säule, die 1,4 % Apiezon L als stationäre Phase enthielt, getrennt. Zur gleichen Zeit berichteten Parker und Kirk (40) über Gaschromatographie von Barbituraten auf einer Säule mit 5 % des Silikongummis SE-30 als stationäre Phase.

Ein schwieriges Problem bei der Gaschromatographie von Barbituraten stellte die Adsorption dieser Verbindungen an das feste Trägermaterial der Säule dar. Diese Adsorption,

die auf die polare Natur der Barbiturate zurückzuführen ist, verursachte Verlust an Material, Verunreinigung der Säule, Peak tailing, schlechte Auflösung und erheblich variierende Retentionszeiten.

Viele Wissenschaftler haben versucht, diese Adsorption durch Vorbehandlung der Säule und des Trägermaterials mit Spezialtechniken zur Beseitigung von aktiven Gruppen zu verringern. Vor allem sind Waschungen mit Säure und Silanisierungsverfahren angewandt worden. Mac Martin und Street (31) haben eine Methode der Hitzebehandlung des Trägermaterials zur Inaktivierung beschrieben.

Mehrere Wissenschaftler haben stationäre Phasen mit polaren Zusätzen gebraucht, um den Adsorptionseffekt des Trägermaterials zu verringern. Cieplinski (14) behandelte das silanisierte Trägermaterial mit bestimmten dimeren und trimeren Säuren und fügte dann SE-30 (1,5 %) hinzu. Er berichtete, dadurch symmetrische Peaks erhalten zu haben. Parker, Fontan und Kirk (38) gebrauchten eine gemischte stationäre Phase mit 1,5 % SE-30 und 2 % Carbowax 20 M. Brochmann-Hanssen (8) führte aus, daß solche Säulen zwar eine bessere Trennleistung hätten, daß aber die Retentionswerte sehr variieren würden und eine qualitative Bestimmung deshalb nicht möglich wäre. Mac Martin und v. Street (9) veröffentlichten 1966 einen Artikel, in welchem sie die Anwendung einer Säule mit 2 % SE-30 und 0,1 % Tristerin auf speziell vorbehandeltem Trägermaterial beschrieben. Sie berichteten über gute Auflösung von 12 Barbituraten und 5 anderen Verbindungen bei konstanten Retentionszeiten.

Zahlreiche Autoren haben zum gaschromatographischen Nachweis von Barbituraten nicht selektive, unpolare Säulen mit stationären Phasen, wie SE-30, SE-52, DC-200, OV-1 und QF-1, in Kombination mit ausgedehnten Deaktivierungsverfahren gewählt.

Da die Trennung von mehreren Barbituraten auf einer einzigen Säule oft nicht gelang, wurden zwei oder mehrere Säulen verwendet.

Da sich bei unpolaren stationären Phasen bei niedrigem Belegungsgrad oft starkes Tailing und schlechte Auflösung zeigten, bei hohem Belegungsgrad aber die Retentionszeiten zu lang wurden und sich starke Adsorption bemerkbar machte, sind viele Wissenschaftler dazu übergegangen, mehr selektive und polarere Säulen mit niedrigem Belegungsgrad anzuwenden, und in der neueren Literatur wird vor allem über die Anwendung von stationären Phasen, wie OV-17 (26, 27, 37, 50), XE-60 (28, 34, 41), Carbowax 20 M (30), PPE-20 (13, 50), SP-1000 (13), Apiezon L (8, 42) und Apiezon M (30), berichtet.

Leach und Toseland (28) bevorzugten eine Säulenfüllung mit 10 % Apiezon L wie auch bereits früher van den Heuvel und Mitarbeiter (21). Sie nahmen längere Retentionszeiten für gute Auflösung in Kauf.

Die wichtigsten, in der Literatur erwähnten stationären Phasen zur gaschromatographischen Trennung von Barbituraten sind mit Angaben über ihre chemische Natur in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das Problem der Adsorption der Barbiturate an das Trägermaterial der Säule bei der Gaschromatographie konnte durch die dargestellten Methoden nur teilweise gelöst werden. Brochmann-Hanssen (8) berichtete, daß man auf jeden Fall damit rechnen müßte, daß Barbituratmengen von etwa $0,1 \mu\text{g}$ völlig an das Trägermaterial adsorbiert würden. Man hat versucht, durch wiederholtes Einspritzen von größeren Barbituratmengen in den Gaschromatographen "die aktiven Stellen zu sättigen". Solche Säulen zeigten aber dann selektive Affinität für bestimmte Verbindungen, und das adsorbierte Barbiturat löste

Tbl. 1

Stationäre Phasen

Handelsname	chemischer Name
Apiezon L	polymere Methylphenyläther und KW bis Molgew. 1500
Apiezon M	polymere Methylphenyläther und KW bis Molgew. 1500
Carbowax 20 M	Polyäthylenglycol 20 000
DC-200	Methylsiliconöl
OV-1	Methylsilicongummi
OV-17	50 % Phenyl Methylsilicongummi Polyäthylenglycoladinat
FF-20	Poly-M-Phenyläther
QF-1	50 % Trifluoronopvl Methylsilicongummi
SE-30	Methylsilicongummi
SE-30	5 % Phenyl Methylsilicongummi
SP-1000	Modifikation von FFAP = Carbowax 20 M/2 Nitro- terephthalsäure
XE-60	25 % Cyanoäthyl Methylsilicongummi

sich bei späteren gaschromatographischen Abläufen mit anderen Verbindungen ab und brachte "falsche" Peaks hervor.

Die Adsorptionseigenschaften der Barbiturate konnten durch Abänderung dieser polaren Verbindungen in weniger polare Derivate verändert werden. Methoden der Alkylierung und der Silylierung der Barbiturate werden in der Literatur angeführt. Bei Alkylierung wird über Methylierungs- und über Äthylierungsverfahren berichtet.

Cook, Riley, Nunn und Budgen (12) beschrieben bereits 1961 eine gaschromatographische Nachweismethode für Methyl-derivate von 11 Barbituraten. Die Barbituratprobe wurde mit dem Methylierungsreagens, Diazomethan in ätherischer Lösung, übergossen, und dann ließ man die Reaktion über Nacht ablaufen. Die gaschromatographische Auftrennung erfolgte auf 2 Säulen mit 15 % Apiezon L und 10 % Polyäthylenglycoladipat als stationäre Phasen. Die 5,5-dialkylsubstituierten Barbiturate ließen sich auf der Säule mit Apiezon L trennen, während die Barbiturate mit zyklischen Substituenten in 5-Position besser auf der Säule mit Polyäthylenglycoladipat aufgelöst werden konnten.

In einem in der neueren Literatur von Horning und Mitarbeitern (22) veröffentlichten Artikel wird eine Methode der Methylierung mit Diazomethan und anschließenden Silylierung zum gaschromatographischen Nachweis von Phenobarbital, Coffein und den Metaboliten dieser Verbindungen vorgeschlagen. Dabei läßt man Diazomethan in ätherischer Lösung nur 15 Minuten auf die Arzneistofflösung einwirken, und das Verfahren ist dadurch insgesamt wesentlich schneller. Die Autoren berichteten über Derivate mit guten gaschromatographischen Eigenschaften. Diese Methode war mit Nachteilen belastet, vor allem war sie wegen des explosiven Diazomethans für die Routinearbeit nicht besonders geeignet.

1966 beschrieb Stevenson (46) eine Methode der Methylierung von Barbituraten auf der Säule mit Tetramethylammoniumhydroxid als Methylierungsreagens. Von 18 Barbituraten konnten 13 auf einer Säule mit 5 % SE-30 als stationäre Phase aufgelöst werden. Stevenson berichtete, daß die Methylierungsreaktion quantitativ wäre, wenn das Molverhältnis von Tetramethylammoniumhydroxid zum Barbiturat mindestens 4 : 1 betragen würde und die Einspritztemperatur etwa 240°C wäre.

Im gleichen Jahr, in dem der Artikel von Stevenson erschienen war, wurde eine Arbeit von Martin und Discoll (33) veröffentlicht, in welcher eine Methylierungsmethode mit Dimethylsulfat beschrieben wurde. Im Gegensatz zum Verfahren von Stevenson erfolgte hierbei die Derivatisierung vor dem Einspritzen in den Gaschromatographen. Bei der Vorbereitung der Barbituratprobe wurden neben der eigentlichen Methylierung mit 0,2 ml Dimethylsulfat mehrere Extraktions- und Verdampfungsschritte durchgeführt. Es wurden 7 gebräuchliche Barbiturate auf einer Säule mit 5 % SE-30 als stationäre Phase chromatographiert. Amobarbital und Pentobarbital konnten in diesem System nicht voneinander getrennt werden. Methylphenobarbital und Phenobarbital gaben zusammen einen Peak - wie bei allen Methylierungsverfahren, weil bei Methylierung beide Verbindungen in Dimethylphenobarbital verwandelt werden. Dies spielt klinisch keine große Rolle, da Methylphenobarbital im Körper in Phenobarbital umgewandelt wird. (16,33). Baylis und Mitarbeiter (3) arbeiteten eine Methylierungsmethode mit Dimethylsulfat zum gaschromatographischen Nachweis der als Antikonvulsiva gebrauchten Substanzen, Phenobarbital und Diphenylhydantoin, im Serum aus, die mit einer langwierigen und komplizierten Vorbereitung der Probe verbunden war.

In einer Arbeit von Fiereck und Tietz (16) über Derivatisierung von Barbituraten mit Dimethylsulfat wurde betont, daß die Methylierung vor der Gaschromatographie der Methylierung auf der Säule vorzuziehen sei, da sich die Derivate quantitativ übereinstimmender bilden würden. Sie chromatographierten

die Methylderivate von 11 Barbituraten und Glutethimid auf einer Säule, die 7 % DC-200 auf Gas Chrom Q enthielt.

Amobarbital und Pentobarbital konnten getrennt werden. Nur Hexobarbital und Glutethimid zeigten eng zusammenliegende Retentionszeiten. Das beschriebene Vorbereitungsverfahren war umständlich und zeitraubend.

Eine Vereinfachung wurde von Stewart und Mitarbeitern (47) erreicht, die die Methylierung mit Dimethylsulfat direkt im Serum oder in der Testlösung durchführten. Die Auftrennung von 6 Barbituraten auf einer Säule mit 3 % SE-52 als stationäre Phase wurde beschrieben.

1969 griff Brochmann-Hanssen und Oke (11) die Idee der Methylierung auf der Säule von Stevenson auf. Sie berichteten, daß sie bei Anwendung der Methode von Stevenson bei den meisten Barbituraten kleine zweite Peaks beobachtet hätten, und sie zogen Trimethylanilinumhydroxid dem Tetramethylammoniumhydroxid als Methylierungsreagens vor, da sie der Meinung waren, daß das erstere unter milderen Bedingungen und in kürzerer Reaktionszeit thermisch zersetzt würde. Es wurde die Methylierung und Auftrennung von 11 Barbituraten, einigen Xanthinbasen und phenolischen Alkaloiden auf einer Säule mit 3 % SE-30 als stationäre Phase beschrieben. Es ließen sich Ipral von Allobarbital und Cyclobarbital von Phenobarbital trennen, 2 Paare, die in dem System von Stevenson nicht aufgelöst werden konnten. Amobarbital und Pentobarbital, die ohne Derivatisierung auf SE-30 gleiche Retentionszeiten haben, wurden ebenfalls getrennt. Barbiturate mit bromierten Substituenten und 2 - Thiobarbiturate gaben zwei oder mehrere Peaks, was auf Zersetzung zurückgeführt wurde. Die Autoren hoben den Vorzug der Schnelligkeit dieser Methode durch Methylierung auf der Säule hervor.

Das Derivatisierungsverfahren von Brochmann-Hanssen und Oke mit Trimethylanilinumhydroxid wurde später von Kunferberg (27) zur Trennung und quantitativen Bestimmung der als Antiepileptica gebrauchten Substanzen, Phenobarbital, Primidon und Diphenylhydantoin, im Plasma bei Gebrauch von 3 % OV-17 als stationäre Phase angewandt. Auch Källberg und Mitarbeiter (28)

berichteten in ihrer Arbeit über gaschromatographischen Nachweis von Phenobarbital in kleinen Blutproben über Methylierung mit Trimethylanilinhydroxid.

Mac Gee (29) beschrieb 1971 in seinem Artikel über schnelle Identifizierung und quantitative Bestimmung von Barbituraten und Glutethimid im Blut eine Äthylierungsmethode. Als Derivatisierungsreagens wurde 40 % Tetraäthylammoniumhydroxid in wässriger Lösung benutzt. Ein Gaschromatogramm mit 5 Barbituraten und Glutethimid wurde dargestellt. Methylphenobarbital und Phenobarbital konnten in diesem System getrennt werden. Der Autor hob hervor, daß im Gegensatz zu den meisten Methylierungsverfahren bei Äthylierung nach seiner Methode wesentlich weniger Nebenpeaks auftreten würden. Mac Gee berichtete, daß durch die Derivatbildung, die Benutzung eines Injektionsteils aus Glas und einer Glassäule sowie den Gebrauch von Glaskörnern (120/140 mesh) als Trägermaterial für die stationäre Phase (OV-1) die Adsorption der Verbindungen an das Säulenträgermaterial auf ein Minimum reduziert werden konnte. Die Schnelligkeit des Verfahrens durch Derivatbildung auf der Säule wurde hervorgehoben.

Silylierung von Barbituraten und zahlreichen anderen Verbindungen wurde durch v. Street (48, 49) vorgeschlagen (1969 und 1971). Als Derivatisierungsreagens wurde bevorzugt N, O - Bistrimethylsilylacetamid verwendet. Es wurden 5 µl des Reagens und dann 5 µl der Acetonlösung des Giftstoffs in die gleiche Mikrospritze aufgezogen und danach zusammen in den Gaschromatographen injiziert. Die Einfachheit und Schnelligkeit durch Derivatbildung im Gaschromatographen wurden vom Autor betont.

Brochmann-Hanssen und Oke (11) wiesen allerdings darauf hin, daß bei Silylierung von Barbituraten keine stabilen Derivate erhalten würden und daß die Peakhöhen nicht konstant wären.

Bei den beschriebenen Methylierungsverfahren werden beide Stickstoffatome der 5,5 disubstituierten Barbitursäuren methyliert. Diese Erkenntnis wurde durch gaschromatographisch-massenspektroskopische (25) und UV-spektrophotometrische (33) Untersuchungen gewonnen. Neville (36) stellte auf Grund von Studien über kernmagnetische Resonanz die 1,3 Dimethylstruktur fest.

Alle Wissenschaftler, die über Derivatisierung von Barbituraten berichteten, hoben hervor, daß wesentlich verbesserte Chromatogramme durch Abänderung der Barbiturate in weniger polare Derivate erhalten werden konnten.

2. Extraktion aus biologischem Material

Beim Nachweis von Barbituraten in biologischem Material muß vor der eigentlichen gaschromatographischen Auftrennung - wie bei anderen Nachweismethoden auch - ein geeignetes Extraktions- und Reinigungsverfahren durchgeführt werden. Blackmore und Jenkins (5) berichteten 1968 über eine Methode der direkten Urininjektion in den Gaschromatographen - ein Prüfungsverfahren, das dazu dienen sollte, die Anwesenheit von Barbituraten auszuschließen. Zur genauen Identifizierung von Barbituraten wird dagegen allgemein eine Vorbereitung der biologischen Probe vor der gaschromatographischen Analyse für notwendig gehalten.

Die meisten Wissenschaftler extrahierten Barbiturate bei saurem pH, also in ihrer Säureform.

Als organische Extraktionsmittel wurden vor allem Chloroform und Äther empfohlen. Leach und Toseland (28) sowie Berry und Grove (4) führten aus, daß durch Äther Barbituratmetaboliten stärker extrahiert würden als durch Chloroform. Auch Watson

und Kalmann (50) stellten eine vermehrte Extraktion von unbekannten Substanzen bei Gebrauch von Äther fest. Fontan und Kirk (23) extrahierten mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Aceton und Äther, Kupferberg (27) wandte Äthylendichlorid und bei einem späteren Extraktionsschritt Hexan an, Mac Gee (29) gebrauchte Toluol und Horning und Mitarbeiter (22) bevorzugten Extraktion mit Isopropanol. Watson und Kalmann (50) berichteten, mit Methylendichlorid besonders reine Extrakte bekommen zu haben.

Bei Derivatisierung der Barbiturate mit Lösungen von Tetramethylammoniumhydroxid, Tetraäthylammoniumhydroxid, und Trimethylanilinhydroxid ist die Lösung des Derivatisierungsreagens zugleich das letzte Extraktionsmittel.

Einige Autoren arbeiteten nur mit Mikrolitermengen an biologischem Material und organischer Extraktionsflüssigkeit (1, 23, 25). Es wurde die Schnelligkeit dieser Methoden hervorgehoben, da sich langwierige Reinigungsschritte überbrücken und die Verdampfung des Lösungsmittels nur wenig Zeit in Anspruch nahm. Jain, Fontan und Kirk (23) führten allerdings vier Extraktionsschritte mit Aceton/Äther (1 : 1) aus, um eine befriedigende Ausbeute der Barbiturate zu bekommen. Anders (1) extrahierte Barbiturate mit Mikrolitermengen Chloroform aus Mikrolitermengen Blut und erhielt mit seiner ersten Methode (bei neutralem pH) und mit seiner zweiten Methode (bei saurem pH) zufriedenstellende Ausbeuten. Lediglich betrug die Ausbeute von Phenobarbital bei der ersten Methode nur 19,5 %. Källberg und Mitarbeiter (25) beschrieben ein Extraktionsverfahren für Phenobarbital aus 100 µl Plasma mit zwei Mal 500 µl - mit Wasser gesättigtem - Äther. Die Barbiturate wurden dann aus der Ätherphase in 25 µl 0,1 Mol Trimethylanilinhydroxid in Methanol/Wasser (1 : 1) extrahiert. Es wurde eine Ausbeute von 97,5 - 100,5 % angegeben.

Bei der Aufbereitung der biologischen Probe wurden bei den meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren ein oder mehrere Reinigungsschritte eingeschlossen. Dabei wurden Waschung mit Phosphatpuffer pH 7,4 (17), pH 7,2 (27) oder pH 6,5 (28) oder auch mit Natriumdihydrogenphosphat in gesättigter Lösung (33,50), als 4 Mol (25) oder als 0,75 Mol (19) Lösung empfohlen. Berry und Grove (4) reinigten Chloroformextrakte des Urins nach einer von Frahm und Mitarbeitern (18) beschriebenen Methode mit 5 % Bleiacetat in wässriger Lösung und berichteten, damit besonders reine Extrakte bekommen zu haben. Eine wirksame Methode zur Vermeidung von Emulsionsbildung wurde von Horning und Mitarbeitern (22) erarbeitet. Sie extrahierten die Arzneistoffe aus verdünntem Plasma, das mit Kaliumcarbonat gesättigt worden war, mit einer kleinen Menge Isopropanol. Die Autoren berichteten, dadurch nicht nur eine gute Extraktion, sondern auch eine klare Trennung der Phasen mit Eiweißpräzipitatbildung an der Oberfläche der wässrigen Schicht erreicht zu haben. Zur Beseitigung von neutralen und basischen Substanzen bei der Extraktion von Barbituraten aus biologischem Material wurde von einigen Wissenschaftlern eine Rückextraktionstechnik angewandt. Dabei wurden die Barbiturate z.B. in wässrige Lösungen von Na OH (8, 17, 28, 41) oder Na_3PO_4 (27) übergeführt und nach Ansäuern in das organische Lösungsmittel zurückextrahiert.

Eine Konzentrierung wurde von vielen Wissenschaftlern durch Eindampfen des letzten Extraktes und Wiederauflösen des Rückstandes in einer kleinen Menge eines geeigneten Lösungsmittels erreicht. Am häufigsten wurde dabei Aceton, Chloroform, Methanol oder Äthanol gebraucht.

Da sich eiweißfreie Flüssigkeiten besser extrahieren lassen, wird öfters eine Enteiweißung empfohlen. Um ein eiweißfreies Filtrat von Körperflüssigkeiten, Organellen oder Massenaufgüssen

zu bekommen, werden in der Literatur verschiedene Variationen von Präzipitationsmethoden mit Natriumwolframat (15, 30) oder auch weinsaurem Aceton oder Alkohol (30) angeführt. Auch v. Street und Mac Martin haben eine solche Fällungsmethode mit Wolframatlösung entwickelt und in mehreren Arbeiten darüber berichtet (31, 32, 48, 49).

Neben relativ spezifischen Extraktionsmethoden für Barbiturate und verwandte Verbindungen werden in der Literatur zahlreiche unspezifische Analyseverfahren zur umfassenden Aufdeckung von basischen, neutralen und sauren Substanzen angetroffen (2, 4, 17, 26, 37, 41, 44 u.a.). Finkle, Cherry und Taylor (17) arbeiteten z.B. ein gaschromatographisches System mit vier Säulen und 3 stationären Phasen sowie ein Chloroformextraktionsschema zur Aufdeckung von zahlreichen Arzneimitteln, Giftstoffen und Stoffwechselprodukten in Körperflüssigkeiten aus. Es wurden die relativen Retentionszeiten für etwa 600 Substanzen in zwei verschiedenen Namensverzeichnissen zusammengestellt.

Zur Differenzierung in saure, neutrale und basische Substanzen wurde selektives Waschen des Extraktes empfohlen (17, 21).

Es wird mehrfach in der Literatur erwähnt, daß auch bei relativ spezifischen Extraktionsverfahren für Barbiturate andere saure, aber auch neutrale und basische Giftstoffe extrahiert werden können und daß dadurch Interfering-Peaks auf dem Chromatogramm erscheinen können (3, 28, 37, 47, 48, 50).

Aber auch körpereigene Substanzen können Interfering-Peaks hervorrufen (22, 37). Von Niyogi und Rieders (37) wurden 24 endogene Verbindungen auf ihre Fähigkeit untersucht,

bei gaschromatographischen Analysen von Arzneistoffen bei direkter Chloroformextraktion aus forensischen Blutproben Interfering-Peaks hervorzubringen. Bei der Untersuchung der Extrahierbarkeit erwiesen sich acht der 24 körpereigenen Stoffe und alle 30 untersuchten Arzneistoffe durch Chloroform direkt extrahierbar. Die relativen Retentionszeiten der endogenen wurden mit jenen der exogenen Verbindungen verglichen. Sowohl körpereigene als auch körperfremde Stoffe wurden in starke und schwache Säuren, neutrale sowie basische Substanzen unterteilt, und es wurde festgestellt, daß Interferenz zwischen Arzneistoffen und endogenen Verbindungen aus verschiedenen Gruppen auftreten kann. Zur Differenzierung wurde selektives Waschen mit schwachen und starken Basen, Säuren, ammoniakalischem AgNO_3 und wässrigem NaHSO_3 empfohlen. Horning und Mitarbeiter (22) beschrieben eine Extraktionsmethode für Phenobarbital, Coffein und die Metaboliten von diesen Verbindungen und stellten Interfering-Peaks durch höhere Fettsäuren fest. Die Autoren berichteten, daß diese durch zweimaliges Waschen mit je 5 ml Isooctan beseitigt werden könnten, ohne daß die Menge der Arzneistoffe und ihrer Metaboliten dadurch wesentlich verändert würde.

3. Identifizierung und quantitative Bestimmung

Von den meisten Autoren wurde die Identifizierung der Barbiturate mit Hilfe der Retentionszeiten oder relativen Retentionszeiten - bezogen auf einen internen Standard - durchgeführt.

In verschiedenen Artikeln wurde darauf hingewiesen, daß die Identität eines Barbiturates durch einen weiteren Parameter erhärtet werden muß. Die Barbituratprobe kann auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität chromatographiert werden (13, 41, 50). Es wurde auch empfohlen, nacheinander zwei unterschiedlich derivatisierte Proben des Barbiturates (49) oder die unveränderte und dann die derivatisierte Barbituratprobe (11, 48, 49) zu chromatographieren. Die Änderung der Retentionszeit wurde dann zur Sicherung der Identität eines Barbiturates gebraucht.

Mehrere Wissenschaftler empfahlen die Kombination von Gaschromatographie mit anderen analytischen Methoden, um die Identifizierung von Barbituraten zu sichern. Parker und Kirk (40) u.a. schlugen vor, die Anwesenheit eines Barbiturates vor der gaschromatographischen Analyse durch UV-Spektrophotometrie zu prüfen. Kombination mit Infrarot-Spektrophotometrie oder Massenspektrometrie wurden von Brochmann-Hanssen (8), v. Street (48) sowie Finkle, Cherry und Taylor (17) vorgeschlagen. Zur Identifizierung einer großen Anzahl saurer und neutraler Arzneistoffe, insbesondere Barbiturate, beschrieben Battista und Machata (2, 30) einen Analysegang unter Anwendung von Gaschromatographie, einer dünn-schichtchromatographischen Untersuchungstechnik und einiger chemischer Vorproben. Bei Horning und Mitarbeitern (22) wurde der in Methanol aufgelöste Rückstand zuerst einem dünn-schichtchromatographischen Verfahren unterworfen, um die Anwesenheit von Arzneistoffmetaboliten zu prüfen. Nach Methylierung und Silylierung wurde Gaschromatographie zur vorläufigen Identifizierung durchgeführt. Die Struktur der Arzneistoffe wurde dann durch Massenspektrometrie festgestellt. Källberg und Mitarbeiter haben ebenfalls die Kombination Gaschromatographie - Massenspektrometrie zur sicheren Identifizierung von Phenobarbital gewählt (25).

Im mehreren Artikeln wurde nicht nur die Identifizierung, sondern auch die quantitative Bestimmung von Barbituraten durch Gaschromatographie beschrieben. Von den meisten Wissenschaftlern wurde hierzu zunächst eine Standardkurve für jedes untersuchte Barbiturat angefertigt, wobei jeweils das Verhältnis von Peakhöhe oder Peakfläche des Testbarbiturates zur Peakhöhe bzw. Peakfläche eines internen Standards gegen verschiedene Barbituratmengen berechnet und graphisch dargestellt wurde. Es sollte sich eine Gerade ergeben, die durch den Nullpunkt geht. Interner Standard und Testlösungen wurden dabei im allgemeinen genau so behandelt wie die biologische Probe. Mit Hilfe der Standardkurve konnte dann die Konzentration des Barbiturates in der Probe bestimmt werden. Es sind Arbeiten über quantitative Bestimmung von unveränderten und derivatisierten Barbituraten veröffentlicht worden.

Es wurde andererseits in der Literatur an verschiedenen Stellen darauf hingewiesen, daß infolge der Adsorption der unveränderten Barbiturate an das Trägermaterial der Säule quantitative Analyse trotz Spezialtechniken der Säulenvorbehandlung und Sättigung der Säule mit dem zu untersuchenden Barbiturat schwierig oder unmöglich sei (11, 16, 27, 33, 47). Auch bei Derivatisierung der Barbiturate schienen Schwierigkeiten bei quantitativem Arbeiten zu bestehen. V. Street (49) wies darauf hin, daß bei Methylierung der Barbiturate mit Trimethylanilinumhydroxid die relativen Peakhöhen nicht konstant seien. Ebenso fand er bei Trimethylsilylderivaten der Barbiturate keine konstanten Peakhöhenverhältnisse. Es wurde aus diesen Gründen auch empfohlen, ein anderes Verfahren zur quantitativen Analyse in den Untersuchungsgang einzuschließen, z.B. UV-Spektrophotometrie (6, 32).

IV. Eigene Problemstellung

In dieser Arbeit sollte eine gaschromatographische Nachweismethode für Barbiturate entwickelt werden, die zur Routineanwendung im chemisch-toxikologischem Labor geeignet ist. Ein solches Analyseverfahren muß einfach, schnell, genügend empfindlich und zuverlässig sein.

Es galt zunächst ein gaschromatographisches System zu finden, in welchem eine optimale Auftrennung von Barbituraten möglich ist. Dabei sollten nicht nur wenige Vertreter dieser Gruppe von Schlafmitteln - wie in früheren Arbeiten -, sondern insgesamt 26 mehr oder weniger gebräuchliche Barbiturate berücksichtigt werden (siehe Tabelle 2). Außerdem sollten auch einige andere Sedativa und Coffein-Verbindungen, die häufig zusammen mit Barbituraten gebraucht werden, - in die Nachweismethode mit einbezogen werden.

Wir beschäftigen uns in dieser Arbeit nicht nur mit dem Nachweis von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen in Lösungen der Reinsubstanzen, sondern auch mit der Identifizierung dieser Substanzen in biologischem Material. Dazu mußte eine Extraktionsmethode gefunden werden, die in wenigen Arbeitsschritten genügend reine Extrakte und zufriedenstellende Ausbeuten ermöglicht, damit eindeutige gaschromatographische Ergebnisse erhalten werden können. Dem Problem von Interfering-Peaks durch natürlich vorkommende Substanzen in Extrakten aus biologischem Material, über das in der Literatur noch wenig berichtet wurde, sollte besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Tbl. 2

Übersicht der Barbiturate

	Name	Substituenten		Schmelz- punkte	Strukturformel
		cyclisch	brom- haltig		
1	Allobarbital			171-173	5,5- Diallyl- BS
2	Amobarbital			156-158	5- Äthyl- 5- isopentyl- BS
3	Aprobarbital			140-141,5	5- Isopropyl- 5- allyl- BS
4	Axeen			148-151	5- Allyl- 5- (ß- hydroxypropyl- - BS
5	Barbital			188-192	5,5- Diäthyl- BS
6	Brallobarbital		+	173	5- Allyl- 5- (2 bromallyl)-BS
7	Butalbital			138-139	5- Isobutyl- 5 allyl- BS
8	Butabarbital			165-168	5- Äthyl- 5- sec.- butyl- BS
9	Butallylonal		+	130-133	5- sec.- Butyl- 5- (2-bromallyl- - BS
10	Butobarbital			124-127	5-Äthyl- 5- Butyl- BS
11	Butyvinal			86- 87	5- Vinyl- 5- (2'-amyl)-BS
12	Crotarbital			117	5-Äthyl-5- (d 2- butenyl)-BS
13	Cyclobarbital	+		171-174	5- Äthyl- 5- (cyclohexen-(1)- yl)- BS
14	Cyclopentobarbital	+		139-140	5- Allyl- 5- (cyclopenten- (2) - yl)- BS
15	Dormovit	+		171	5- Furfuryl- 5- isopropyl -BS
16	Heptabarbital	+		169-171	5- Äthyl- 5- (cyclohepten- (1) yl)- BS
17	Hexobarbital	+		145-147	1,5 Dimethyl- 5- (cyclohexen- (1)- yl- BS
18	Methohexital			94	1- Methyl- 5- allyl- 5- (1- methylpentin-(2)-yl)-
19	Methylphenobarbital	+		176	1- Methyl- 5- äthyl- 5- phenyl- - BS

Name	Substituenten		Schmelz- punkte	Strukturformel
	cyclisch	brom- haltig		
Pentobarbital			128-129	5- Äthyl- 5- (1- methylbutyl)- BS
Phenobarbital	+		174-178	5- Äthyl- 5- phenyl- BS
Propallylonal		+	177-179	5- Isopropyl- 5- (2 bromallyl) - BS
Propylbarbital			148	5,5- Dipropyl- BS
Secobarbital			96-100	5- (1- methyl-butyl)- 5 allyl - BS
Sigmodal		+	161-163	5- (1- methyl-butyl) -5 (2- bromallyl - BS
Albutal			107-110	5- sec.- Butyl- 5 - allyl- BS

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Gas chromatographische Auftrennung von Barbituraten aus Lösungen der Reinsubstanzen

1. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten ohne Derivatisierung

a) Versuche

Wir testeten drei, in der neueren Literatur zur Auftrennung von Barbituraten vorgeschlagenen stationären Phasen: 1) SP-1000 (13), 2) OV-17 (26,27, 37, 50) und 3) Apiezon M + Carbowax 20 M (2, 30).

Apparative Details bei Anwendung von SP-1000 als stationäre Phase

Als Gaschromatograph wurde der Fraktometer F 20 der Firma Perkin Elmer, der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet ist, gebraucht. Wir verwendeten eine 1,20 m lange Glassäule mit 4 Windungen sowie 4 mm Außen- und 2 mm Innendurchmesser. Die Säule wurde mit 1 % SP-1000 auf Supelcoport, 100/120 mesh, gefüllt. Die Temperaturen wurden folgendermaßen gewählt: Säulentemperatur 225°C, Temperatur im Einspritzblock und Detektortemperatur ca. 255°C (Einstellung 5). Die Strömungsgeschwindigkeiten der Gase hatten folgende Werte: Stickstoff (Trägergas) 22 ml/Minute, Wasserstoff 30 ml/Minute und Luft 500 ml/Minute. Als Schreiber diente ein Apparat der Firma Perkin Elmer, Modell 159. Die Papiergeschwindigkeit betrug 1,0 cm/Minute.

Für die Injektionen wurde - wie bei allen Versuchen dieser Arbeit - eine 10 µl Hamilton Mikrospritze verwendet.

Anmerkung:

Jede Säule, die in dieser Arbeit benützt wurde, wurde vor der Füllung zuerst mit destilliertem Wasser und dann mit Aceton durchspült. Die Säulen wurden selbst gefüllt. Nach der Füllung erfolgte über Nacht Konditionieren der Säule bei 250°C.

Apparative Details bei Anwendung von OV-17 als stationäre Phase

Als Gaschromatograph diente wieder der Fraktometer F 20 mit Flammenionisationsdetektor von Perkin Elmer. Wir benützten eine 2,20 m lange Glassäule mit 8 Windungen sowie 2,5 mm Innen- und 4 mm Außendurchmesser. Als Säulenfüllungsmaterial wurde 3 % OV-17 auf Gas Chrom Q, 100/120 mesh verwendet. Folgende Temperaturen wurden nach Vorversuchen als optimal befunden: Säulentemperatur 190°C, Temperatur im Einspritzblock und Detektortemperatur ca. 223°C (Einstellung 4). Die Strömungsgeschwindigkeit von Stickstoff wurde auf 27 ml/Minute eingestellt, die von Wasserstoff und Luft hatten Werte von 30 ml/Minute bzw. 500 ml/Minute. Es wurde ein Schreiber der Firma Philips, Modell PR 2210/1958 gebraucht. Die Papiergeschwindigkeit betrug 0,7 cm/Minute.

Apparative Details bei Anwendung von Apiezon M und Carbowax als stationäre Phase

Auch bei diesen Versuchen wurde der Fraktometer F 20 mit FID von Perkin Elmer als Gaschromatograph verwendet. Wie bei SP-1000 benutzten wir auch jetzt eine kurze Glassäule (1,20 m mit 4 Windungen und einem Innen- und Außendurchmesser von

2 mm bzw. 4 mm. Als Säulenfüllungsmaterial diente 4 % Apiezon M und 0,5 % Carbowax auf Chromosoh G. Eine Säulentemperatur von 225⁰ C erwies sich als optimal. Die Temperatur im Einspritzblock und die Detektortemperatur betrugen ca. 255⁰ C (Einstellung 5). Die Strömungsgeschwindigkeit der Gase zeigten folgende Werte: Stickstoff 39 ml/Minute, Wasserstoff 30 ml/Minute und Luft 500 ml/Minute.

Herstellung der Testlösungen und Gaschromatographie

Von den Reinstsubstanzen der 26 Barbiturate, die als Salze zur Verfügung standen, wurden gleiche Mengen abgewogen. Nach Hinzufügen von 2 Tropfen 10 % Na OH wurden die einzelnen Proben in Methanol aufgelöst. Die Konzentration betrug etwa 2 mg/ml.

1 µl der Lösung wurde jeweils in den Gaschromatographen injiziert.

Alle Barbiturate wurden einzeln auf jeder der 3 Säulen chromatographiert. Die Abschwächung wurde immer so eingestellt, daß die Spitze des Peaks auf dem Chromatogramm erschien. Die Retentionszeiten wurden aus dem Abstand zwischen der Injektion und der Vertikalen durch die Peakspitze berechnet.

b) Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Unter den dargestellten gaschromatographischen Bedingungen erschienen bei allen Versuchen mit jeder der 3 Säulen die 26 Barbiturate innerhalb einer zufriedenstellenden Zeit. Die längsten Retentionszeiten wurden bei Anwendung der Säule mit Apiezon M + Carbowax 20 M beobachtet, was auf die höhere

Polarität dieser stationären Phase zurückzuführen ist. Phenobarbital, das hierbei als letztes Barbiturat erschien, hatte eine Retentionszeit von 38,6 Minuten.

Jede der getesteten Säulen hat Peaks hervorgebracht, die nahezu symmetrische Form und nur leichtes Tailing zeigten. Bei Gebrauch der Säule mit OV-17 als stationäre Phase wurde bei Barbituraten mit längeren Retentionszeiten ein mäßiges Fronttailing beobachtet.

Die Retentionszeiten der 26 Barbiturate für die 3 Säulen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Auf der Säule mit SP-1000 können die Barbiturate- Butabarbital, Butobarbital und Crotarbital - nicht getrennt werden. Weiterhin zeigen auch Amobarbital und Butalbital sowie Allobarbital, Pentobarbital und Methylophenobarbital jeweils die gleichen Retentionszeiten.

Auf der OV-17 Säule kann Butobarbital nicht von Butalbital getrennt werden. Die Barbiturate - Aprobarbital, Crotarbital und Propylbarbital sowie Butyvinol und Pentobarbital - haben jeweils sehr nahe beisammenliegende Retentionszeiten, so daß praktisch eine Auftrennung dieser Verbindungen nicht möglich ist.

Bei Gebrauch von Apiezon M + Carbowax 20 M als stationäre Phase können Butabarbital, Butobarbital und Aprobarbital nicht voneinander getrennt werden. Ferner zeigen Amobarbital und Allobarbital die gleichen Retentionszeiten. Die Barbiturate, Methylophenobarbital und Talbutal unterscheiden sich in ihren Retentionszeiten nur geringfügig.

Insgesamt wurde beobachtet, daß bei allen 3 Säulen in einem bestimmten Bereich eine größere Anzahl von Barbituraten gleiche oder ähnliche Retentionszeiten aufwiesen und wichtige Barbiturate nicht voneinander getrennt werden konnten.

Tbl. 3
Retentionszeiten

stationäre Phase	SP-1000	OV-17	Apiezon M + Carbowax
Säulentemperatur	225 ^o C	190 ^o C	225 ^o C
Axeen	0,75	2,00	1,45
Methohexital	1,40	5,30	3,20
Barbital	2,20	2,15	4,45
Hexobarbital	2,45	8,95	5,70
Propylbarbital	2,95	3,50	5,95
Crotarbitol	3,10	3,45	6,35
Butabarbitol	3,10	3,80	6,50
Butobarbitol	3,10	3,65	6,50
Aprobarbitol	3,20	3,35	6,50
Butalbitol	3,35	3,65	7,00
Amobarbitol	3,35	4,20	7,15
Allobarbitol	3,60	3,10	7,15
Pentobarbitol	3,60	4,85	7,55
Methylphenobarbitol	3,60	10,71	8,15
Talbutol	3,90	4,50	8,20
Butyvinal	4,20	4,80	8,85
Secobarbitol	4,45	5,95	9,80
Cyclopentob.	8,85	10,00	19,00
Dormovit	10,90	11,10	23,15
Propallylonal	11,10	11,70	24,10
Cyclobarbitol	11,25	14,70	25,30
Brallobarbitol	12,30	10,20	26,30
Sigmodal	13,55	14,35	29,55
Heptabarbitol	14,50	21,00	31,85
Butallylonal	15,20	19,45	34,15
Phenobarbitol	19,30	17,30	38,60

Bereich mit ähnlichen oder gleichen Retentionszeiten

Bei allen Experimenten zeigte sich mit großer Deutlichkeit die Eigenschaft der Barbiturate, an das Trägermaterial der Säule zu adsorbieren. Die Adsorption ist auf die polare Natur dieser Verbindungen zurückzuführen. Wir haben beobachtet, daß oft erst nach wiederholten Einspritzungen ein und desselben Barbiturates ein Peak auf dem Chromatogramm erschien. Dies war so zu erklären, daß erst eine "Sättigung" der aktiven Gruppen am Trägermaterial erfolgen mußte, bevor das Barbiturat aufgedeckt werden konnte. Dadurch war natürlich auch die Empfindlichkeit herabgesetzt. Durch das adsorbierte Material kam es zur Verunreinigung der Säule, was ein häufiges Auswechseln nötig machte. Durch Ablösung von adsorbierten Barbituraten traten oft Peaks in Erscheinung, die von zurücklassenden Einspritzungen stammten. Bei aufeinanderfolgenden gaschromatographischen Abläufen mit verschiedenen Barbituraten sah man auf dem Chromatogramm mit der Zeit eine Reihe von Peaks, obwohl vor dem letzten Ablauf nur ein einziges Barbiturat eingespritzt worden war.

Wegen der dargestellten Folgen der Adsorptionseigenschaften der Barbiturate wäre ein routinemäßiger Ablauf der Barbiturat-analyse sehr in Frage gestellt. Zudem wäre eine solche Nachweismethode zu unzuverlässig und nicht genügend empfindlich. Um diese Nachteile auszuschalten, haben wir bei unserer weiteren Arbeit eine Veränderung der polaren Barbiturate in weniger polare Derivate durchgeführt und versucht, optimale Bedingungen zum Nachweis solcher derivatisierter Barbiturate zu finden. Es war auch zu hoffen, daß chemisch sehr ähnlich strukturierte Barbiturate nach Derivatisierung besser getrennt werden könnten.

2. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten nach Äthylierung mit Tetraäthylammoniumhydroxid (TEH)

a) Versuche

Das Prinzip dieser Experimente beruht auf einer von Mac Gee (29) beschriebenen Methode.

Apparat

Als Gaschromatograph wurde der Pye 104, der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet ist, gebraucht. Wir benützten eine 1,70 m lange Glassäule. Als Füllungs-material diente 3 % SE-30 auf Chromosob G. Eine Säulentemperatur von 180°C und eine Strömungsgeschwindigkeit des Stickstoffs (Trägergas) von 55 ml/Minute haben sich als optimal erwiesen. Die Detektortemperatur betrug 250°C ; für die Injektionstemperatur wählten wir Einstellung 7. Als Schreiber diente ein Honeywell Modell. Die Papiergeschwindigkeit betrug 1,40 cm/Minute.

Reagens: 25 % Tetraäthylammoniumhydroxid in wässriger Lösung

Herstellung der Testlösungen und Gaschromatographie

Von den Reinsubstanzen der 26 Barbiturate wurde mit einem Spatel jeweils ein Stäubchen, weniger als 1 mg, aufgenommen und einzeln in spitz zulaufende Reagenzgläser gebracht.

Jede Probe wurde vor der Chromatographie in 50 μ l TEH aufgelöst, das mit einer 50 μ l Hamilton Mikrospritze hinzugefügt worden war. Zum Verschließen der Reagenzgläser wurden - wie bei allen Experimenten dieser Arbeit - Glas- oder Plastikstopfen benützt.

1 μ l der Lösung wurde jeweils in den Gaschromatographen injiziert.

Wir ließen den Apparat nach jeder Einspritzung et. 20 Minuten laufen. Innerhalb dieser Zeit erschienen alle getesteten Barbiturate.

b) Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Durch Abänderung der Barbiturate in weniger polare Äthyl-derivate konnten die Nachteile der Adsorption, die bei Chromatographie von unveränderten Barbituraten aufgetreten waren, beseitigt werden. Die Peaks der Äthyl-derivate zeigten symmetrische Formen und nur geringes Tailing.

Bei dem beschriebenen Äthylierungsverfahren traten jedoch neue Schwierigkeiten auf. Eine ganze Reihe von Barbituraten, vorwiegend solche mit längeren Retentionszeiten, traten nämlich als Doppelpeaks auf. Phenobarbital und Methylphenobarbital zeigten darüber hinaus noch einen weiteren Peak. In Tabelle 4 sind die Barbiturate nach der Anzahl der Peaks, die bei dieser Derivatisierungsmethode aufgetreten sind, unterteilt. Trotz mannigfacher Variationen der gaschromatographischen Bedingungen und Anwendung von verschiedenen Säulenfüllungen gelang es nicht, die Doppelpeaks zu beseitigen. Sie werden sicherlich durch unvollständig äthylierte Derivate hervorgerufen. Wir nehmen an, daß durch die niedrige Konzentration von 25 % des TEH, das uns zur Verfügung stand, eine vollständige Äthylierung nicht möglich ist. In der Arbeit von Mac Gee (29), der mit 40 % TEH arbeitete, wurde das Problem von Doppelpeaks nicht beschrieben.

Tbl. 4

Anzahl der Peaks bei Gaschromatographie von äthylierten Barbituraten (TEH).

Barbiturate, die mit einem einzigen Peak erschienen

Hexobarbital	Butabarbital
Barbital	Butobarbital
Brallobarbital	Amobarbital
Allobarbital	Sigmodal
Aprobarbital	Talbutal
Crotarbital	Butyvinal
Propallylonal	Pentobarbital
Butalbital	Methohexital

Barbiturate, die mit einem Doppelpeak erschienen

Axeen	Dormovit
Secobarbital	Cyclopentobarbital
Butallylonal	Heptabarbital
Cyclobarbital	

Barbiturate, die mit 3 Peaks erschienen

Methylphenobarbital	Phenobarbital
---------------------	---------------

Da eine solche Nachweismethode für Barbiturate wegen der Doppelpeaks, besonders bei Anwesenheit von mehreren Verbindungen, keine eindeutigen Ergebnisse liefern würde, haben wir ein anderes Derivatisierungsverfahren mit Bildung von methylierten Barbituraten versucht.

Anmerkung:

Wir haben auch eine Äthylierungsmethode mit Diäthylsulfat versucht. Die Ergebnisse waren auch hierbei nicht zufriedenstellend.

3. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten nach Methylierung mit Dimethylsulfat (DMS)

a) Versuche

Ein Derivatisierungsverfahren für Barbiturate mit Dimethylsulfat wurde erstmals von Martin und Discoll (33) beschrieben. Die Vorbereitung der Probe wurde bei unseren Experimenten nach einer von Stewart, Duke und Willcox (47) empfohlenen Methode durchgeführt.

Apparat

Als Gaschromatograph wurde der Pye 104 mit FID gebraucht. Wir benützten eine 1,70 m lange Glassäule. Als stationäre Phase verwendeten wir 3 % SE-30; Chromosob G, 80/100 mesh, war das Trägermaterial. Die Säulentemperatur betrug 165°C, die Detektortemperatur 180°C und die Injektionstemperatur entsprach Einstellung 4. Die Strömungsgeschwindigkeit des Stickstoffs war mit 55 ml/Minute optimal. Es wurde ein Honeywell Schreiber benützt. Die Papiergeschwindigkeit betrug 1,40 cm/Minute.

Reagenzien

Dimethylsulfat

n-Heptan

Kaliumcarbonat, gesättigte wässrige Lösung

Vorbereitung der Proben und Gaschromatographie

Von jeder Reinsubstanz der 26 Barbiturate in Salzform wurde eine 10 mg % Lösung in destilliertem Wasser hergestellt. In ein 10 ml Reagenzglas wurden jeweils 1 ml der einzelnen Barbituratlösung und 1 ml der gesättigten Kaliumcarbonatlösung gebracht. Mit einer bpoendorfnipette wurden 0,4 ml DMS hinzugefügt. Dabei wurde unter dem Abzug mit Schutzbrille und Schutzhandschuhen gearbeitet. Die Probe wurde kurz manuell geschüttelt und dann 4 Minuten lang auf einem kochenden Wasserbad erhitzt. Danach erfolgte Abkühlung in einem Eisbad. Nach Hinzufügen von 1 ml n-Heptan wurde 5 Minuten lang maschinell geschüttelt und anschließend 2 Minuten lang zentrifugiert. Die Heptanschicht wurde mit einer Pasteurpipette abgetrennt und in ein zweites Reagenzglas gebracht.

1 µl des Heptanextraktes wurde jeweils in den Gaschromatographen injiziert.

Es wurde bei maximaler Empfindlichkeit chromatographiert, um auch kleinere Nebenpeaks zu erfassen. Wenn ein Peak in Erscheinung trat, wurde die Abschwächung so eingestellt, daß die Spitze des Peaks auf dem Chromatogramm zu sehen war. Wir ließen den Gaschromatographen nach jeder Injektion ca. 20 Minuten laufen. Innerhalb dieser Zeit konnten alle untersuchten Barbiturate aufgedeckt werden.

b) Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Wie bei den Versuchen mit Äthylderivaten zeigte sich auch bei diesem Methylierungsverfahren der Vorteil der Gaschromato-

graphie von wenig polaren Derivaten der Barbiturate durch Wegfall des Adsorptionseffekts. Die Methode war genügend empfindlich. Die Peaks zeigten symmetrische Formen und nur wenig Tailing.

Zudem wurde noch ein weiterer Vorteil der Derivatisierung deutlich. Die Gaschromatographische Auftrennung der methylierten Barbiturate war nämlich wesentlich günstiger als die der unveränderten Verbindungen. Alle Barbiturate konnten voneinander getrennt werden. Eine Ausnahme bildeten Methylphenobarbital und Phenobarbital, die die gleiche Retentionszeit hatten, weil beide - wie in der Literatur mehrfach erwähnt - in Dimethylphenobarbital bei Methylierung verwandelt werden (16, 33). Zwar zeigten mehrere Barbiturate nahe beisammenliegende Retentionszeiten, wie Propylbarbital und Butalbarbital - Butabarbital und Butobarbital - Amobarbital und Talbutal - sowie Dormovit und Cyclopentobarbital, doch spielt dies in der Praxis keine große Rolle, weil meist ein Barbiturat des jeweiligen Pears ein wenig gebräuchliches Mittel darstellt. Alle wichtigen Barbiturate konnten eindeutig voneinander getrennt werden. Eine Anhäufung von Barbituraten mit gleichen oder ähnlichen Retentionszeiten in einem bestimmten Bereich wie bei Gaschromatographie von nicht derivatisierten Verbindungen war jetzt nicht mehr zu beobachten.

Die Retentionszeiten dieser Methyllderivate der Barbiturate entsprachen im Verhältnis jenen, die durch das im nächsten Abschnitt beschriebene Methylierungsverfahren erhalten wurden (Tabelle 6), waren nur insgesamt etwas kürzer wegen der unterschiedlichen Gaschromatographischen Bedingungen.

Bei einer größeren Zahl von Barbituraten traten bei dieser Derivatisierungsmethode mit DMS ein oder mehrere Nebenpeaks auf (Tabelle 5). Bei einigen Barbituraten konnten zusätzliche Peaks dadurch verhindert werden, daß die Probe bei der

Vorbereitung nicht erhitzt wurde. Wegen der Giftigkeit des Methylierungsreagens DMS, das in relativ großer Menge nötig war, hielten wir diese Nachweismethode für Barbiturate zur Routineanwendung nicht besonders geeignet. Außerdem war sie wegen des erforderlichen Extraschritts für die Methylierung etwas zeitraubend. Wir haben deshalb noch ein anderes Alkylierungsverfahren geprüft.

Tbl. 5

Nebenpeaks bei Gaschromatographie von Barbituraten nach Methylierung mit DMS

Axeen	Secobarbital
Barbital	Brallobarbital ++
Allobarbital	Methohexital +++
Aprobarbital	Propallylonal
Cortarbital	Dormovit +
Propylbarbital	Cyclopentobarbital ++
Butalbital	Hexobarbital +
Butobarbital	Sigmodal
Butabarbital	Phenobarbital ++
Amobarbital	Methylphenobarbital ++
Talbutal +	Cyclobarbital ++
Pentobarbital	Butallylonal ++
Butyvinal	Heptabarbital ++

+ ein Nebenpeak
 ++ zwei Nebenpeaks
 +++ drei Nebenpeaks

Die Barbiturate sind in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten aufgeführt.

4. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen nach Methylierung mit Trimethylanilinumhydroxid (TMAH)

a) Versuche

Die Anregungen zu diesen Experimenten wurden durch eine Arbeit von Brochmann-Hanssen und Oke (11) erhalten.

Apparat

Als Gaschromatograph für diese Versuche diente der Fraktometer F 20 von Perkin Elmer, der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet ist. Es wurde eine 2,20 m lange Glassäule mit 8 Windungen sowie einem Innen- und Außendurchmesser von 2,5 bzw. 4 mm benützt. Die Säulenfüllung bestand aus 3 % OV-1 auf Gas Chrom Q 100/120 mesh. Folgende Temperaturen wurden als optimal befunden: Säulentemperatur 165°C, Detektor- und Verdampfungstemperatur ca. 210°C (Einstellung 4). Die Strömungsgeschwindigkeiten der Gase hatten folgende Werte: Stickstoff 18 ml/Minute, Wasserstoff 30 ml/Minute und Luft 500 ml/Minute. Es wurde ein Philips Schreiber verwendet. Die Papiergeschwindigkeit betrug 0,7 cm/Minute.

Reagens: 0,1% Trimethylanilinumhydroxid in Methanol (Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)

Vorbereitung der Proben und Gaschromatographie

Von den Reinsubstanzen der 26 Barbiturate, die als Salze zur Verfügung standen, wurden gleiche Mengen abgewogen. Nach Hinzufügen von 2 Tropfen 10 % Natronlauge erfolgte Auflösung in

Methanol. Die Endkonzentration betrug 10 mg %. 5 ml der einzelnen Lösungen wurden jeweils in ein spitz zulaufendes Zentrifugierröhrchen gebracht und auf einem Wasserbad bei 80°C eingedampft. Der Rückstand wurde dann in 30 µl TMAH, das mit einer 50 µl Hamilton Mikrospritze hinzugefügt worden war, aufgelöst.

Je 1 µl der Probe wurde in den Gaschromatographen injiziert.

Wir chromatographierten bei maximaler Empfindlichkeit, um alle Nebenpeaks zu erfassen. Wenn ein Peak in Erscheinung trat, wurde die Abschwächung so eingestellt, daß die Spitze des Peaks auf dem Chromatogramm zu sehen war. Bei Barbituraten mit kurzen Retentionszeiten genügte 1/16, bei solchen mit längeren Retentionszeiten 1/4 der maximalen Empfindlichkeit. Die Retentionszeiten wurden aus dem Abstand zwischen vertikalem Anstieg des Lösungsmittelpeaks und der Senkrechten durch die Peakspitze berechnet.

b) Ergebnisse

Auch bei Methylierung mit TMAH waren die Vorteile der Chromatographie von wenig polaren derivatisierten Barbituraten zu erkennen. Mit dieser Methode wurden die besten Peakformen erhalten. Sie waren schmal, symmetrisch und frei von Tailing. Wie bereits erwähnt, war die zeitliche Aufteilung innerhalb der Zeitspanne von 25 Minuten, in der alle Barbiturate aufgedeckt werden konnten, besser als bei den nicht derivatisierten Barbituraten.

Bei den bromierten Barbituraten (Brallobarbital, Sigmodal, Propallylonal und Butallylonal) sowie bei Hexobarbital und Methylphenobarbital trat noch ein zweiter Peak auf. Insgesamt

war die Anzahl der Nebenpeaks also bei Methylierung mit TMAH wesentlich geringer als bei jener mit DMS. Die wenigen zusätzlichen Peaks bei der Alkylierungsmethode mit TMAH verwirren das chromatographische Bild nicht und können als Hilfe zur Identifizierung der entsprechenden Barbiturate dienen.

Wird zu wenig von dem Methylierungsreagens hinzugefügt, so können Peaks durch unvollständig derivatisierte Barbiturate auftreten, die aber einfach durch Zugabe von TMAH beseitigt werden können. Auch eine weitere Verdünnung mit Methanol scheint die Methylierungsreaktion günstig zu beeinflussen. So haben wir beobachtet, daß oft durch Verdünnung des Probenansatzes mit Methanol allein die Nebenpeaks verschwanden. Wir haben festgestellt - wie auch in der Literatur erwähnt (25) -, daß die Barbituratlösung in TMAH nicht älter als 2 Stunden sein sollte, weil sonst Zersetzungsprodukte durch alkalische Degeneration in Erscheinung treten können.

Neville (36) hat auf Grund von Studien über kernmagnetische Resonanz erkannt, daß bei Methylierung sowohl mit DMS als auch mit TMAH N-Methylierung erfolgt und immer 1,3 - Dimethylbarbiturate gebildet werden. Deshalb werden auch bei diesen beiden Verfahren die gleichen Retentionszeiten für die entsprechenden Barbiturate erhalten. In Tabelle 6 sind die Retentionszeiten der 1,3-Dimethylbarbiturate und einiger anderer methylierter Verbindungen, die nach diesem Verfahren chromatographiert wurden, zusammengestellt.

Diese Methode hat gegenüber dem Verfahren mit Anwendung von DMS als Methylierungsreagens den Vorteil, daß für die Derivatisierung kein Extraschritt notwendig ist, weil die Bildung der Methylderivate auf der Säule erfolgt.

Tbl. 6

Retentionszeiten von 1,3 -Dimethylbarbituraten und einigen anderen methylierten Verbindungen

stationäre Phase	3 % OV - 1	
	165° C	200° C
Axeen	0,70	
Barbital	2,55	
Meprobamat	3,15	
Methyprylon	3,15; 3,70; 4,30	
Allobarbital	3,70	
Aprobarbital	4,05	
Crotarbital	4,30	
Propylbarbital	4,80	
Butalbital	4,85	
Butobarbital	4,90	
Butabarbital	5,00	
Amobarbital	5,95	
Talbutal	6,00	
Pentobarbital	6,70	
Butyvinal	6,85	
Secobarbital	8,00	
Brallobarbital	9,50; 3,85	
Methohexital	10,00	
Propallylonal	10,70; 4,35	
Dormovit	11,00	

Säulentemperatur	165°C	200°C
Cyclopentobarbital	11,15	
Coffein	14,00	4,55
Hexobarbital	14,15; 3,0	4,55; 1,30
Glutethimid	14,70	4,70
Sigmodal	15,20	2,30
Methylphenobarbital	16,55; 3,70	5,0; 1,45
Phenobarbital	16,55	5,00
Cyclobarbital	16,85	5,30
Butallylonal	20,55; 8,55	6,10; 2,85
Heptabarbital	24,15	7,05
Primidon		7,85
Methaqualon		14,00
Diphenylhydantoin		18,45

Wir haben diese gaschromatographische Methode zur Routineanwendung für Barbituratanalyse gewählt, weil sie einfach, schnell, genügend empfindlich ist und eine optimale Auftrennung der 26 untersuchten Barbiturate erlaubt.

5. Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen mit langen Retentionszeiten

Diejenigen Barbiturate und andere Verbindungen, deren Retentionszeiten in dem unter 4) dargestellten System zwischen 15 und 25 Minuten liegen, haben wir nach Erhöhung der Säulentemperatur auf 200°C unter sonst gleichbleibenden gaschromatographischen Bedingungen und bei Anwendung des beschriebenen Methylierungsverfahrens mit TMAH chromatographiert. Drei weitere Sedativa - Primidon, Methaqualon und Diphenylhydantoin - wurden mit eingeschlossen.

Durch Chromatographieren bei einer Säulentemperatur von 200°C war eine schnellere und deutlichere Aufdeckung von Barbituraten und bestimmten anderen Verbindungen möglich. Coffein und Hexobarbital gaben in diesem System einen gemeinsamen Peak. Eine Unterscheidung ist durch den zusätzlichen Peak bei Hexobarbital möglich. Alle anderen untersuchten Substanzen konnten auch bei der erhöhten Temperatur eindeutig voneinander getrennt werden. Die Retentionszeiten sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Bei unserer weiteren Arbeit, dem Nachweis von Barbituraten in biologischem Material, haben wir die beschriebene Methylierungsmethode mit TMAH angewandt und die Gaschromatographie bei den unter 4) angeführten Bedingungen durchgeführt. Lediglich bei Anwesenheit von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen mit langen Retentionszeiten wurde bei einer Säulentemperatur von 200°C chromatographiert.

II. Nachweis von Barbituraten in biologischem Material

1. Ausarbeitung einer Extraktionsmethode

a) Extraktion von Barbituraten aus 2-10 ml Urin mit μ l-Mengen von Chloroform und Diäthyläther

Die Versuche wurden mit einem einige Monate alten Urin durchgeführt, der nach dünnsschichtchromatographischer Analyse Phenobarbital und Barbital enthielt. Die UV-spektrophotometrische Untersuchung nach Goldbaum (18+) hatte eine Gesamtkonzentration dieser beiden Barbiturate von 5,96 mg % ergeben.

Versuchsbeschreibung

Die Versuche wurden nacheinander mit 2, 4, 6, 8 und 10 ml Urin durchgeführt. Nach Ansäuern mit 1-2 Tropfen von 10 % H_2SO_4 wurde der Probe jeweils 50 μ l Chloroform zugefügt. Weitere Versuchsreihen wurden in gleicher Weise mit 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l und 250 μ l Chloroform gemacht. Nach Schütteln, Zentrifugieren und Abtrennen der wässrigen Schicht wurde der Chloroformextrakt eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 μ l TMAH-Lösung aufgelöst, und 1 μ l der Lösung wurde in den Gaschromatographen injiziert.

Die gleichen Experimente wurden mit Äther als Extraktionsmittel durchgeführt.

Gaschromatographische Bedingungen für alle Versuche im II.

Teil dieser Arbeit

Gaschromatograph: Fraktometer F 20 mit FID von Perkin Elmer

Säule: 2,20 m lange Glassäule, 2,5 mm I.D., 4 mm A.D.

Füllungsmaterial: 3 % OV-1 auf Gas Chrom Q, 100/120 mesh

Säulentemperatur: 165°C, bzw. 200°C

N₂- Strömungsgeschwindigkeit: 18 ml/Minute.

Es wurde immer das Methylierungsverfahren mit TMAH angewandt.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Bei Extraktion mit Chloroform erschien der Barbitatpeak bei maximaler Empfindlichkeit sehr klein oder überhaupt nicht.

Die größte, wenn auch nicht zufriedenstellende Höhe erreichte er bei der Kombination - 6 ml Urin und 200 µl Chloroform.

Interfering-Peaks zeigten sich bei Chloroformextrakten nicht auf den Chromatogrammen. Bei den Versuchen mit Ätherextrakten war in keinem Fall ein Barbitatpeak zu erkennen. Es erschienen jedoch mehrere hohe Peaks bei einer Abschwächung von 1/16 der maximalen Empfindlichkeit, die keinem Barbiturat zugeordnet werden konnten. Phenobarbital wurde weder bei Chloroform- noch bei Ätherextraktion entdeckt.

Aufgrund dieser Ergebnisse bei Gebrauch von µl-Mengen an Extraktionsflüssigkeit erkannten wir, daß die Ausbeute der Barbiturate zu gering war, um auch bei leichteren Vergiftungsfällen deutliche chromatographische Erscheinungsbilder zu bekommen. Um die Ausbeute zu verbessern, haben wir deshalb weitere Versuche mit größeren Mengen an organischem Lösungsmittel unternommen. Das Auftreten von Störpeaks durch Extraktion von unbekannten Substanzen durch Äther - wie es auch in der Literatur beschrieben ist (4, 28) - veranlaßte uns, fortan Chloroform als Extraktionsflüssigkeit zu gebrauchen.

- b) Extraktion von Barbituraten aus 5 ml Urin mit 5 ml Chloroform; Reinigung mit Phosphatpuffer

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Versuche mit Proben desselben Urins wie bei den vorhergehenden Experimenten durchgeführt.

Versuchsbeschreibung

Eine 5 ml Urinprobe wurde mit 1 - 2 Tropfen von 10 % H_2SO_4 angesäuert. Dann wurden 5 ml Chloroform hinzugefügt. Nach Schütteln und Zentrifugieren wurde die wässrige Phase abpipettiert. Der Chloroformextrakt wurde dann eingedampft und der Rückstand wurde mit 30 μ l TMAH-Lösung aufgenommen. 1 μ l der Lösung wurde in den Gaschromatographen eingespritzt.

In gleicher Weise wurde ein "leerer" Urin zur Kontrolle aufgearbeitet und chromatographiert.

Zur Prüfung der Reinheit der Reagenzien wurden 5 ml Chloroform ohne Urin ebenso behandelt.

Bei weiteren Experimenten wurde der Chloroformextrakt des Urins mit zwei 5 ml Portionen von Phosphatpuffer, pH 7, 4, durch Ausschütteln gereinigt.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Bei Gebrauch von 5 ml Chloroform konnte eine entscheidend verbesserte Ausbeute erzielt werden, was durch einen deutlichen Barbitalpeak bei 1/16 der maximalen Empfindlichkeit sichtbar wurde. Phenobarbital zeigte sich allerdings auch jetzt nur als kleiner Peak bei maximaler Empfindlichkeit. Es traten in der Nähe des Barbitalpeaks zusätzliche Peaks, ein etwa gleich großer und mehrere kleinere, auf, die nicht identifiziert werden konnten. Diese Störpeaks waren nach zweimaliger Waschung mit Phosphatpuffer verschwunden. Bei

Anwendung dieser Reinigungsschritte war der Phenobarbitalpeak sehr klein und der Barbitalpeak bei 1/4 der maximalen Empfindlichkeit deutlich sichtbar. Bei Prüfung der Reagenzien und des Kontrollurins bekamen wir Chromatogramme, die frei von Peaks waren.

Bei Anwendung des zuletzt dargestellten Verfahrens an einer Reihe von Blut- und Urinproben zeigte sich, daß, besonders bei biologischem Material von in Fäulnis übergegangenen Leichen oder wenn andere Arzneistoffe in großer Menge vorhanden waren, die Reinigung mit Phosphatpuffer nicht ausreichte. Es wurde deshalb eine Rückextraktionsmethode versucht.

- c) Extraktion von Barbituraten aus biologischen Proben mit Chloroform; Rückextraktionsmethode

Die Versuche wurden an verschiedenen, besonders lange gelagerten Urinproben durchgeführt.

Versuchsbeschreibung

5 ml Urin wurden, wie bei 2 beschrieben, mit 5 ml Chloroform extrahiert, und das Chloroform wurde dann mit zwei 5 ml Portionen Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Nach Entfernung der wässrigen Schicht wurden zum Chloroform 5 ml von gesättigtem Na_2CO_3 gegeben. Es folgte Schütteln, Zentrifugieren und Abtrennen der wässrigen Phase. Diese wurde dann mit zwei 5 ml Portionen Chloroform gereinigt. Danach wurde die Na_2CO_3 -Lösung tropfenweise mit 10 % H_2SO_4 bis zur sauren Reaktion versetzt. Nun erfolgte Rückschüttelung mit 5 ml Chloroform und nochmals zweimalige Reinigung der organischen Phase mit je 5 ml Phosphatpuffer. Das Chloroform wurde eingeampft und der Rückstand wurde in 30 μl TMAH-Lösung aufgelöst. 1 μl wurde in den GC injiziert.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Es wurden auch bei sehr lange gelagerten Proben zufriedenstellend saubere Extrakte erhalten. Die Ausbeute der Barbiturate war jedoch deutlich geringer als bei Anwendung des unter b) beschriebenen Extraktionsverfahrens. Außerdem erschien uns die Methode zu zeitraubend.

Um diese Nachteile zu beseitigen, haben wir diese Rückextraktionstechnik insoweit verändert, daß die Reinigungsschritte reduziert wurden und die Chloroformmenge auf 50 ml erhöht wurde.

Das folgende Extraktionsverfahren wurde auch von Bogan und Smith (6) beschrieben.

- d) Extraktion von Barbituraten aus 1-5 ml Proben mit 50 ml Chloroform; Reinigung mit Phosphatpuffer; Rückextraktionstechnik

Die Experimente wurden mit verschiedenen, z.T. sehr lange gelagerten Blut- und Urinproben und mit dem Urin, der auch zu den unter a) und b) beschriebenen Versuchen verwendet wurde, zum Vergleich durchgeführt.

Versuchsbeschreibung

1 - 5 ml Blut oder Urin wurden mit Weinsäure bis pH 3 angesäuert. 50 ml Chloroform wurden zur Probe gegeben. Nach Schütteln und Zentrifugieren sowie Abtrennen der wässrigen Schicht wurde das Chloroform mit 5 ml Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen, und danach wurden zur organischen Schicht 5 ml 1 n NaOH hinzugefügt. Es folgte Schütteln, Zentrifugieren und Abtrennung der wässrigen Schicht. Diese wurde dann tropfenweise mit HCl bis pH 3 angesäuert. Nach Rückschütteln mit 50 ml Chloroform wurde die organische Phase eingedampft. Danach wurde der Rückstand mit 30 µl TMAH-Lösung aufgenommen. Es folgte Injektion von 1 µl der Lösung in den Gaschromatographen.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Es konnte bei allen untersuchten biologischen Proben eine zufriedenstellende Reinigung erreicht werden. Die Ausbeute der Barbiturate war sehr gut. Bei dem alten Urin, der auch zu den unter a) und b) beschriebenen Versuchen verwendet worden war, trat nunmehr ein deutlicher Barbitatpeak bei 1/256 der max. Empfindlichkeit und ein großer Phenobarbitalpeak bei max. Empfindlichkeit auf.

Insgesamt schien uns diese Methode noch zu zeitraubend, und wir haben eine weitere Vereinfachung versucht.

- e) Extraktionsmethode für Barbiturate aus Körperflüssigkeiten zur Routineanwendung im toxikologischen Labor

Die in diesem Verfahren durchgeführte Reinigung der organischen Phase mit Bleiacetatlösung wurde auch von Berry und Grove (4) nach einer Idee von Frahm (18) angewandt.

Versuchsbeschreibung

5 ml Urin oder Blut wurden mit Weinsäure bis pH 3 angesäuert und dann mit 50 ml Chloroform 5 Minuten ausgeschüttelt. Nach Trennung der Phasen wurde das Chloroform filtriert und dann mit 5 ml 5 % Bleiacetatlösung durch Ausschütteln (2 Minuten) gereinigt. Das Chloroform wurde nun wiederum filtriert und in einer Glasschale auf einem Wasserbad bei 70°C bis zu einem Volumen von etwa 5 ml eingedampft. Nach Umfüllung des Chloroformrestes in ein spitz zulaufendes Röhrchen erfolgte vollständige Eindampfung. Der Rückstand wurde in 30 µl TMAH-Lösung aufgenommen. 1 µl der Lösung wurde in den Gaschromatographen injiziert.

Ergebnisse

Es konnte eine einfache Extraktionsmethode für Barbiturate gefunden werden, die nur wenige unkomplizierte Arbeitsschritte erfordert.

Wenn ein mittlerer oder höherer Barbituratgehalt erwartet werden kann, sollten nur 5 ml oder weniger Chloroform zur Extraktion verwendet werden. Dies erhöht die Schnelligkeit des Verfahrens. Für den in Abb. 10 gezeigten Fall wurde aus 1 ml Urin mit nur 50 µl Chloroform extrahiert.

Durch Reinigung mit Bleiacetatlösung wurden genügend saubere Extrakte erhalten, so daß sich mehrfaches Waschen und Rückextraktionstechniken erübrigten.

Infolge der relativ großen Menge an Extraktionsflüssigkeit und der Reduzierung auf einen einzigen Reinigungsschritt wurde eine sehr gute Ausbeute erreicht, so daß auch bei leichten Vergiftungsfällen eindeutige gaschromatographische Ergebnisse erhalten werden konnten.

Diese Extraktionsmethode wurde bei allen, am Ende der Arbeit dargestellten, praktischen Fällen angewandt. (Abb. 2 - 13).

2. Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie

a) Vorbemerkungen

Bei der Vorbereitung von Proben aus Mageninhalten für den gaschromatographischen Nachweis von Barbituraten wurden in manchen Fällen, besonders bei Proben von in Fäulnis übergegangenen Leichen, mit unserer Extraktionsmethode keine genügend sauberen Extrakte erhalten. Es wurden auch verschiedene, in der Literatur angegebene Verfahren probiert.

(15, 25, 30, 31, 32, 48, 49), was ebenfalls zu keiner Lösung des Problems führte. Es zeigten sich breite, unförmige Peaks, z.T. mit langen Retentionszeiten. Oft mußte man eine Stunde und länger warten, bis alle Peaks erschienen waren und häufiges Konditionieren der Säule war nötig. Um reinere Extrakte aus Mageninhalten zur gaschromatographischen Analyse zu bekommen, haben wir deshalb in die Vorbereitung der Probe ein dünnschichtchromatographisches Trennungsverfahren mit einbezogen.

b) Versuchsbeschreibung

Eine Probe von Mageninhalt wurde nach der Methode von Valov (49+), einer Eiweißfällungsmethode mit Natriumwolframatlösung aufgearbeitet. Nach Verdampfung des Äthers in einer Glasschale wurde der Rückstand in etwa 1 ml Äthanol aufgelöst.

Diese Lösung wurde nunmehr dem dünnschichtchromatographischen Verfahren von Komm (26+) unterworfen. Die Äthanollösung wurde dabei bandörmig auf die Platte aufgetragen. Als Fließmittel wurde Diäthyläther-Aceton-Dioxan-Ammoniak (30 : 30 : 30 : 10) verwandt.

Danach wurde ein Streifen der Platte abgeschnitten und mit 1 % Hg NO_3 -Lösung besprüht. Die barbiturathaltigen Streifen wurden im UV-Licht markiert. Das Kieselgel dieser Streifen wurde mit einem Spatel getrennt abgekratzt und in 10 ml Reagenzgläser gebracht.

Anschließend wurde das Kieselgel mit jeweils 5 ml Aceton ausgeschüttelt. Es wurde 2 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Acetonextrakt in ein spitz zulaufendes Röhrchen gegossen und auf einem Wasserbad bei 70°C eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 μl TMAH-Lösung aufgenommen. 1 μl dieser Lösung wurde in den GC injiziert.

c) Ergebnisse

Wenngleich das dargestellte Verfahren auch etwas zeitraubend ist, liefert es doch ausgezeichnete Ergebnisse. Es wurden klare, von Interferenz-Peaks freie Gaschromatogramme erhalten. Durch die Kombination mit der dünnschichtchromatographischen Technik war nunmehr auch eine zuverlässige gaschromatographische Analyse von Barbituraten in Mageninhalten möglich.

3. Andere Arzneistoffe und körpereigene Substanzen, die mit extrahiert und gaschromatographisch erfaßt werden

a) Andere Arzneistoffe

Vorbemerkungen

Bei Anwendung des beschriebenen Extraktionsverfahrens für Barbiturate aus Körperflüssigkeiten traten unter den dargestellten gaschromatographischen Bedingungen oft andere schwach saure, aber auch neutrale und schwach basische Substanzen, die häufig zusammen mit Barbituraten gebraucht werden, in Erscheinung. Diese Verbindungen interferieren nicht mit den untersuchten Barbituraten. Nur Coffein und Hexobarbital zeigen die gleiche Retentionszeit, wenn bei einer Säulentemperatur von 200°C chromatographiert wird. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Zusammenstellung

	Glutethimid
Meprobamat	Primidon
Methyprylon	Methaqualon
Coffein	Diphenylhydantoin

Gaschromatographisches Verhalten der einzelnen Verbindungen

Meprobamat (Miltan [®])

Die Retentionszeit dieses Sedativums fällt nach Behandlung mit TMAH mit jener des Hauptpeaks von Methyprylon zusammen. Eine Unterscheidung dieser beiden Verbindungen ist dadurch möglich, daß Meprobamat nur mit 1 Peak, Methyprylon dagegen mit 3 Peaks erscheint.

Methyprylon (Noludar [®])

Dieses Sedativum tritt bei Injektion einer Testlösung der Reinsubstanz mit TMAH in den Gaschromatographen mit 3 Peaks auf (RZ: 3,15; 3,55; 4,30). Bei Einspritzung eines Urinextraktes von einem Patienten, der eine Überdosis Noludar eingenommen hatte, wurden ebenfalls 3 Peaks erhalten (RZ: 3,15; 3,70; 4,45). Die Retentionszeiten der ersten Peaks stimmen bei Injektion der Testlösung und des Urinextraktes überein, während sich die Retentionszeiten der zweiten und dritten Peaks gering unterscheiden. Es ist anzunehmen, daß chemisch sehr ähnliche Stoffwechselprodukte des Methyprylon gebildet werden, die leicht veränderte Retentionszeiten bewirken. Wird eine nicht derivatisierte Testlösung von Methyprylon eingespritzt, erscheint nur 1 Peak (RZ: 4,30); bei Injektion des entsprechenden unveränderten Urinextraktes treten 2 Peaks auf (RZ: 4,30; 4,55). Siehe Abbildung 6.

Coffein

Diese schwach basische Substanz wurde sehr häufig auf den Chromatogrammen entdeckt. Coffein erscheint nach Behandlung mit TMAH mit einem einfachen Peak, der ein leichtes Front-tailing zeigt. Siehe Abb. 4, Abb. 8 und Abb. 9.

Glutethimid (Doriden®)

Wie auch in der Literatur mehrfach beschrieben (2, 16, 28, 29, 41, 48 u.a.), erscheint dieses Sedativum in der sauren Fraktion und kommt häufig zusammen mit Barbituraten vor. Siehe Abb. 7

Primidon

Dieses Antikonvulsivum steht dem Phenobarbital chemisch nahe und wird im Körper zu diesem oxydiert (6). Bei einer Säulentemperatur von 165°C hat es nach Behandlung mit TMAH eine lange Retentionszeit (RZ: 27,0 Min.), und es wird deshalb besser bei 200°C chromatographiert (RZ: 7,85 Min.).

Methaqualon (Revonal®)

Dieses Schlafmittel, das ebenfalls sehr häufig zusammen mit Barbituraten angetroffen wird, wird mit unserer Methode nicht besonders gut extrahiert. Wegen seiner langen Retentionszeit nach Behandlung mit TMAH wird es auch besser bei einer Säulentemperatur von 200°C aufgedeckt. Siehe Abb. 9

Diphenylhydantoin (Zentropil®)

D. kommt häufig in Kombination mit anderen Antikonvulsiva vor, vor allem mit Phenobarbital und Primidon. Es hat nach Behandlung mit TMAH unter den untersuchten Substanzen die längste Retentionszeit, RZ bei 200°C: 18,45 Min.

Anmerkungen

Bromharnstoffe, die sehr häufig in Kombination mit Barbituraten gebraucht werden, werden unter den gegebenen Bedingungen zerstört und können mit mehreren Peaks vor dem Barbitalpeak erscheinen.

Bei Anwesenheit eines Barbiturates, das einen Äthylsubstituenten trägt, kann ein Peak auftreten, der dem Barbital entspricht. Leach und Toseland (28), die auch diese Beobachtung gemacht haben, erörtern, daß es sich dabei wahrscheinlich tatsächlich um Barbital handelt, das als Abbauprodukt des äthylierten Barbiturates auftritt. Siehe Abb. 11 und Abb. 13.

Prüfung des Verfahrens an einem Testserum

Zur Prüfung unserer gaschromatographischen Nachweismethode von Barbituraten und einigen anderen Verbindungen in biologischem Material haben wir ein von der Arzneimittelfirma Lederle hergestelltes Trockenserum, dem 7 Sedativa in einer Konzentration von je 2 mg % zugesetzt worden waren, verwendet. Das Serum wurde in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst, und 5 ml der Lösung wurden dem Verfahren bei einer Säulentemperatur von 165°C und 200°C unterworfen. Die Extraktion wurde mit 5 ml Chloroform durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 A und Abb. 1 B gezeigt.

b) Körper eigene Substanzen

Vorbemerkungen

Bei Anwendung der beschriebenen Analyse-methode an zahlreichen Blut- und Urinproben traten auf den Chromatogrammen häufig Peaks von unbekannten Substanzen auf. Diese Interfering-Peaks zeigen konstante Retentionszeiten: 4,05 Min. (2,85 cm); 9,85 Min. (6,9 cm) und 24,00 Min. (16,8 cm). Gelegentlich erschien auch nur der eine oder andere dieser Peaks. Ebenso lieferte das erwähnte Testserum bei Extraktion mit 50 ml Chloroform ein Chromatogramm mit 2 dieser unbekannten Peaks. Da von diesem Serum bekannt war, daß es nur 7 Arzneistoffe enthielt, schlossen wir, daß die Interfering-Peaks von körpereigenen Substanzen stammen mußten.

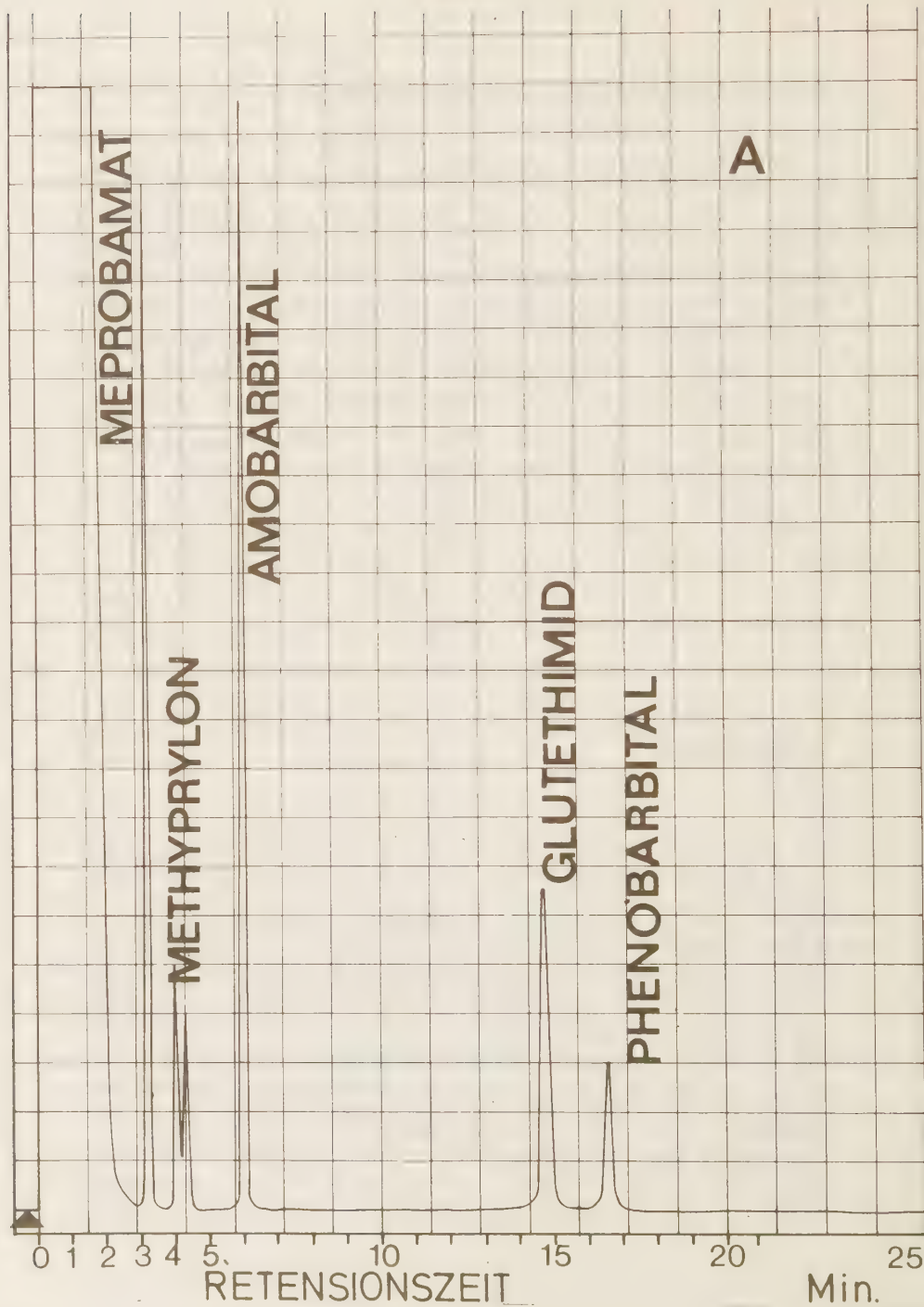


Abb. 1 A: Gaschromatogramm eines Serumextraktes mit 2 Barbituraten und 5 verwandten Verbindungen. Säulentemp. 165°C, Abschwächung 1/16.

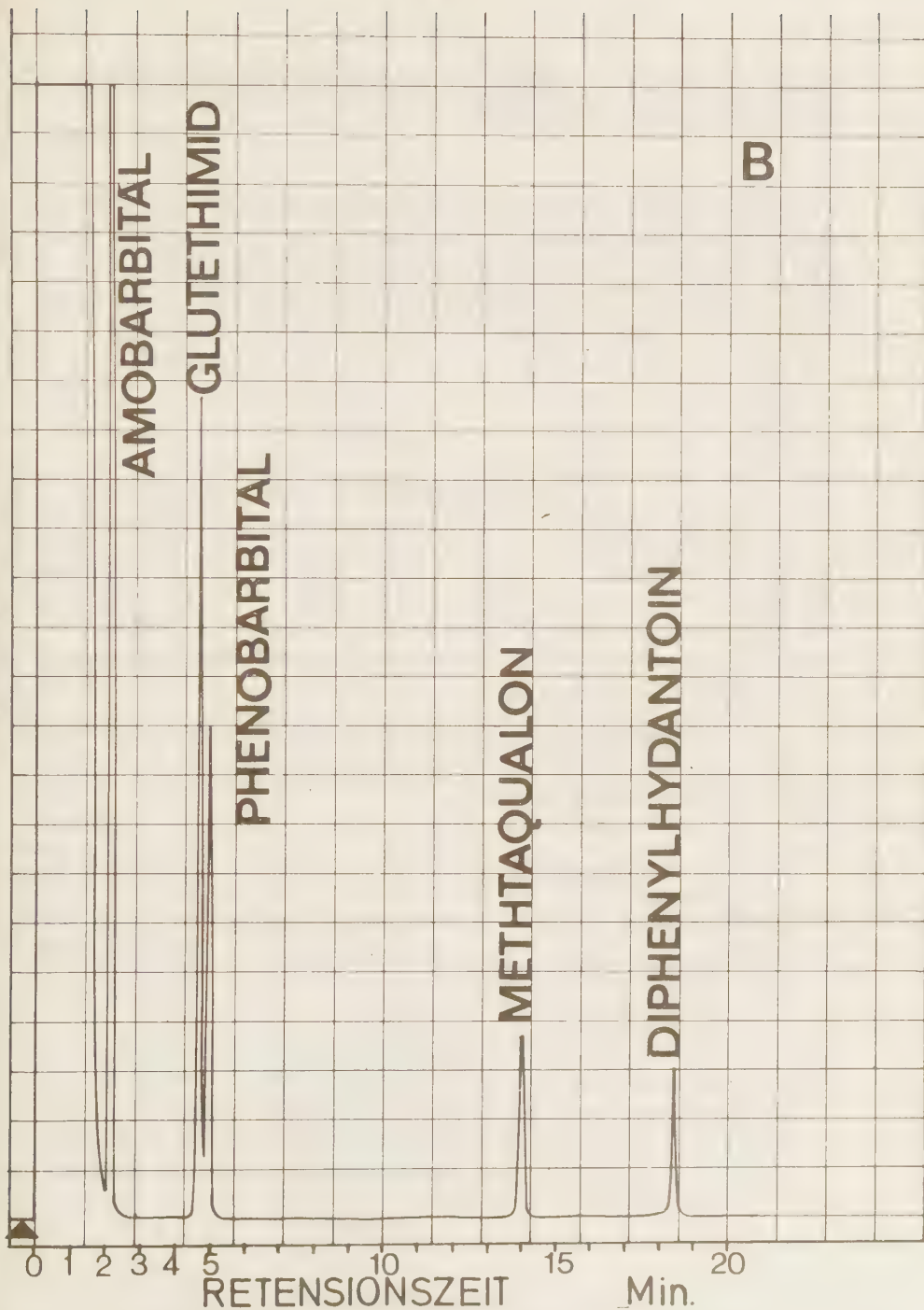


Abb. 1 B: Gaschromatogramm des gleichen Serumextraktes wie bei 1 A bei einer Säulentemperatur von 200°C, Abschwächung 1/16.

Identifizierung der unbekannten endogenen Substanzen, welche Interfering-Peaks hervorrufen

Wir haben insgesamt 18 natürlich vorkommende Substanzen untersucht, wobei als Richtschnur die Arbeit von Niyogi und Rieders (37) diene. Die in dieser Arbeit aufgeführten, direkt mit Chloroform extrahierbaren endogenen Verbindungen aus der sauren und neutralen Gruppe wurden in unsere Versuche einbezogen. Außerdem untersuchten wir noch einige andere Substanzen, die wesentliche Bestandteile von Körperflüssigkeiten sind.

Es wurden Testlösungen der Reinsubstanzen der endogenen Verbindungen hergestellt, indem jeweils ein Stäubchen, weniger als 1 mg, in 30 μ l TMAH gelöst wurde. 1 μ l der Lösung wurde in den GC injiziert. Alle Substanzen wurden zunächst bei einer Säulentemperatur von 165° C und anschließend bei 200° C chromatographiert.

Die aufgetretenen Peaks wurden mit den Interfering-Peaks, die bei Chromatographie von Extrakten aus biologischem Material erschienen waren, verglichen.

In Tabelle 7 sind die Retentionszeiten der endogenen Substanzen aufgeführt. Sie sind nach folgenden Gesichtspunkten in 3 verschiedene Gruppen unterteilt:

1. Die erste Gruppe umfaßt Substanzen, die bei Injektion der Testlösungen ihrer Reinsubstanzen mit TMAH in den GC, unter den gegebenen gaschromatographischen Bedingungen weder bei 165° C, noch bei 200° C Säulentemperatur einen Peak innerhalb von 25 Minuten hervorbringen.
2. In der 2. Gruppe sind diejenigen Substanzen aufgeführt, die bei Injektion der Testlösung mit TMAH in den GC in diesem gaschromatographischen System erscheinen, deren Peaks aber nicht mit den Interfering-Peaks, die in Chromatogrammen von biologischen Probenextrakten gefunden werden,

übereinstimmen. Es ist anzunehmen, daß diese Verbindungen bei unserer Methode nicht extrahiert oder nicht erfaßt werden.

3. Die 3. Gruppe enthält Substanzen, die beim Chromatographieren der Testlösungen der Reinsubstanzen mit TMAH unter diesen gaschromatographischen Bedingungen erscheinen und deren Peaks mit den Interfering-Peaks übereinstimmen, die regelmäßig in Chromatogrammen von biologischen Probenextrakten entdeckt werden.

Tbl. 7

Körpereigene Substanzen

Retentionszeit (Min.)		kein Peak	Peak nur bei Testlösg.	Peak bei Test- lösg. u. biol. Probe
bei 165°C	bei 200°C			
1,35			p-Hydroxybenz- aldehyd	
2,70			p-Hydroxy phenyl- essigsäure	
3,15			p-Hydroxyben- zoesäure	
4,05				Laurinsäure
8,00	2,80		Hippursäure	
9,85	3,15			Myristinsäure
24,00	6,30			Palmitinsäure
	7,35		Bernsteinsäure	
	12,85		Stearinsäure	
-	-	Milchsäure		
-	-	Zitronens.		
-	-	Weinsäure		
-	-	Brenztraubens.		
-	-	Harnsäure		
-	-	Harnstoff		
-	-	Allantoin		
-	-	Stearin		
-	-	Cholesterin		

Tatsächlich waren die immer auftretenden endogenen Verbindungen den Stoffen der Gruppe 3 zuzuordnen. Diese bei Chromatographie von biologischen Probenextrakten unter den gegebenen Bedingungen auftretenden Interfering-Peaks werden durch die Fettsäuren-Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure-hervorgerufen. Die Retentionszeiten dieser Substanzen steigen mit zunehmender Zahl an Kohlenstoffatomen. Horning und Mitarbeiter (22) fanden in ihrem gaschromatographischen System Interfering-Peaks durch Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolensäure, während wir auch niedriger molekulare Fettsäuren entdeckten. Die methylierten Fettsäuren zeigen einzelne, schmale und symmetrische Peaks. Ein zusätzlich gelegentlich auftretender kleiner Peak bei biologischen Proben mit einer Retentionszeit von 22,30 Minuten (15,60 cm) konnte nicht identifiziert werden. Er wurde stets mit Palmitinsäure zusammen beobachtet.

Die Fettsäuren zeigten oft höhere Peaks als die zu analysierenden Arzneistoffe. Außerdem fällt die Retentionszeit von Laurinsäure mit der von Arobarbital zusammen. Die Retentionszeiten von Myristinsäure und Methohexital sowie von Palmitinsäure und Heptabarbital liegen jeweils sehr nahe beisammen. Der Nachweis dieser Barbiturate war damit sehr in Frage gestellt.

Beseitigung der Interfering-Peaks durch Abänderung des Extraktionsverfahrens

Es wurde versucht, eine geeignete Chloroformmenge für die Extraktion zu finden, bei der interferierende Substanzen mäßig oder nicht extrahiert werden, ohne daß die Ausbeute der Barbiturate und der erwähnten anderen Arzneistoffe leidet.

Für die Experimente wurden wiederum die Testseren mit den 7 zugesetzten Arzneistoffen (je 2 mg %) verwendet. Gleiche Probenmengen des Serums wurden in 5 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Je eine Probe wurde mit 1, 5, 10, 20 und 50 ml Chloroform nach unserer Methode extrahiert. Es wurde bei einer Säulentemperatur von 165° C chromatographiert. Die Peakhöhen der endogenen und exogenen Verbindungen wurden miteinander verglichen. Die Substanzen, Methaqualon und Diphenylhydantoin, wurden wegen ihren langen Retentionszeiten nicht berücksichtigt.

Wir bekamen folgende Ergebnisse:

1. Bei Extraktion mit großer Chloroformmenge (50 ml) erschienen alle Arzneistoffe mit hohen Peaks bei 1/16 der maximalen Empfindlichkeit. Der kleinste von diesen war der Phenobarbitalpeak. Etwa die gleiche Höhe wie dieser zeigten bei gleicher Abschwächung die Peaks von Myristinsäure und Palmitinsäure.

2. Bei Extraktion mit mittlerer Chloroformmenge (10 und 20 ml) hatten die Peakhöhen der Arzneistoffe bei 1/16 der maximalen Empfindlichkeit kaum abgenommen. Lediglich der Phenobarbitalpeak war nur noch bei 1/4 der max. Empfindlichkeit deutlich zu erkennen. Die Höhen der Interfering-Peaks waren erheblich reduziert und waren wesentlich niedriger als die Phenobarbitalpeakhöhe.

3. Bei kleinem Extraktionsvolumen (1 und 5 ml) erreichten die Giftstoffe bei 1/4 der maximalen Empfindlichkeit noch ausreichend hohe Peaks. Der Phenobarbitalpeak war nur noch bei maximaler Empfindlichkeit deutlich sichtbar. Dabei waren aber die Interfering-Peaks verschwunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei Verminderung des Chloroformvolumens von 50 auf 5 ml bei der Extraktion die Ausbeute der untersuchten Arzneistoffe nur wenig abnimmt. Eine etwas stärkere Abnahme der Ausbeute ist bei Phenobarbital zu verzeichnen. Die Fettsäuren, die in unserem gaschromatographischen System Interfering-Peaks hervorrufen, werden aber bei kleiner Chloroformmenge wesentlich schlechter extrahiert. Wenn eine Arzneistoffkonzentration von 2 mg % oder mehr in der biologischen Probe erwartet werden konnte, haben wir deshalb fortan ein Chloroformvolumen von 1 - 5 ml zur Extraktion benutzt.

4. Identifizierung und quantitative Bestimmung von Barbituraten

a) Identifizierung von Barbituraten

Nach Injektion von 1 µl des TMAH-Extraktes der biologischen Probe lassen wir den Gaschromatographen etwa 25 Minuten bei einer Säulentemperatur von 165° C laufen. Die Retentionszeiten der erscheinenden Peaks werden mit jenen verglichen, die bei Chromatographie von Testlösungen der Reinsubstanzen der Barbiturate und einiger anderer Verbindungen erhalten worden sind. Damit wird eine Identifizierung vorgenommen. Da sich trotz gleichbleibender gaschromatographischer Bedingungen die Retentionszeiten im Laufe der Zeit etwas verändern können, wird täglich eine Kontrolllösung mit Phenobarbital chromatographiert und die Retentionszeit geprüft. Eine Abweichung wird durch Veränderung der Temperatur ausgeglichen, so daß der ursprüngliche Retentionswert wieder erhalten wird. Es wird außerdem eine Lösung der Reinsubstanz des nachgewiesenen Arzneistoffs zur Kontrolle injiziert. In Zweifelsfällen chromatographieren wir außerdem den Extrakt und die entsprechende Testlösung in nicht derivatisiertem Zustand und vergleichen

die Retentionszeiten. In vielen Fällen haben wir auch die Identifizierung mit einer dünn-schichtchromatographischen Methode gesichert. Um Substanzen mit längeren Retentionszeiten zu erfassen, wird das gleiche Verfahren bei einer Säulentemperatur von 200° C durchgeführt.

b) Quantitative Bestimmung von Barbituraten

Wegen der großen Nachteile des gaschromatographischen Arbeitens mit nicht derivatisierten Barbituraten, die sich besonders bei quantitativer Analyse zeigen, haben wir versucht, quantitative Bestimmung mit methylierten Barbituraten durchzuführen. Es zeigte sich, daß das Peakhöhenverhältnis zwischen dem zu analysierenden Barbiturat und dem internen Standard zwar ziemlich konstant war, daß sich aber aus den Werten der Peakhöhenverhältnisse bei verschiedenen Konzentrationen keine Gerade konstruieren ließ. Diese Beobachtungen wurden auch durch v. Street (49) beschrieben, der zur quantitativen Analyse nicht derivatisierte Verbindungen bei spezieller Säulenvorbehandlung gebraucht. Wir ziehen es vor, die quantitative Barbituratbestimmung mit UV-Spektrophotometrie nach Goldbaum (18+) durchzuführen. Dieses Verfahren dient gleichzeitig, die Anwesenheit von Barbituraten zu erhärten.

5. Praktische Beispiele

Optimale gaschromatographische Nachweismethode für Barbiturate und einige andere Substanzen (Meprobamat, Methyrylon, Coffein, Glutethimid, Primidon, Methaqualon, Diphenylhydantoin) in biologischem Material

a) Extraktion aus Blut und Urin

Reagenzien und Materialien

Chloroform

Weinsäure, gesättigte Lösung in destilliertem Wasser

Bleiacetat, 5 % Lösung in destilliertem Wasser

Trimethylanilinumhydroxid, 0,1 % Lösung in Methanol

(Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)

zwei 100 ml Scheidetrichter (bzw. zwei 10 ml Reagenzgläser mit Plastikstopfen)

zwei 5 ml Glaspipetten

eine bzw. drei Pasteurpipetten

eine 50 µl und eine 10 µl Hamilton Mikrospritze

ein 50 ml Meßzylinder

zwei Glasrichter

eine Glasschale

ein 10 ml, spitz zulaufendes Zentrifugierröhrchen mit Plastikstopfen

Filterpapier, Nr. 597 hy, Ø 90 mm

pH Papier

Verfahren

1. 5 ml Blut oder Urin werden mit einer Glaspipette in einen Scheidetrichter gebracht. Die Probe wird tropfenweise mittels einer Pasteurpipette mit Weinsäure bis pH 3 versetzt. Danach werden 50 ml Chloroform abgemessen und hinzugefügt. (Beachte die Anmerkung).
Es wird 5 Minuten manuell geschüttelt und dann etwas gewartet, bis sich die Phasen getrennt haben.

2. Die Chloroformphase wird in einen zweiten Scheidetrichter filtriert, und dann werden 5 ml Bleiacetatlösung mit einer Glaspipette hinzugefügt. Es wird etwa 2 Minuten geschüttelt und danach wieder etwas gewartet.
3. Die abgesetzte Chloroformschicht wird in eine Glasschale filtriert.
4. Das Chloroform wird auf einem Wasserbad bei 70° C bis auf ein Volumen von etwa 5 ml eingedampft. Dieser Chloroformrest wird in das spitz zulaufende Röhrchen gefüllt und dann vollständig eingedampft. Die Innenwand der Glasschale wird mit etwa 1 ml Chloroform nachgespült. Diese Flüssigkeit wird dann ebenfalls in das Röhrchen gegossen und eingedampft.
5. Der Rückstand wird in 30 µl Trimethylanilinumhydroxidlösung, die durch einen Durchstechstopfen mit einer 50 µl Mikrospritze aus dem Behälter entnommen worden ist und in das Röhrchen gespritzt worden ist, aufgelöst.
1 µl der Lösung wird in den Gaschromatographen injiziert.
Treten Nebenpeaks durch unvollständig methylierte Derivate auf, so wird zunächst Verdünnung der Probe mit Methanol vorgenommen. Ist dies unzureichend, wird weiterhin TMAH-Lösung hinzugefügt.

Anmerkung

Wird eine Barbituratkonzentration von 2 mg% oder mehr angenommen, so erfolgt die Extraktion mit 1 - 5 ml Chloroform. Statt der Scheidetrichter werden in diesem Fall 10 ml Reagenzgläser verwendet. Die Vermischung von organischer und wässriger Phase erfolgt jeweils mit Hilfe eines Schüttelapparates. Die Abtrennung der wässrigen Schicht wird mit einer Pasteurpipette

vorgenommen. Nach der Ausschüttelung mit Bleiacetatlösung wird das Chloroform unmittelbar in das spitz zulaufende Röhrchen filtriert und eingedampft. Im übrigen wird die Extraktion wie bei Gebrauch von 50 ml Chloroform ausgeführt.

b) Extraktion aus Mageninhalt

Verfahren

1. Eine Probe von Mageninhalt wird nach der Methode von Valov (49+) aufgearbeitet.
Nach Verdampfung des Äthers in einer Glasschale wird der Rückstand in etwa 1 ml Äthanol aufgelöst.
2. Nun folgt Dünnschichtchromatographie nach der Methode von Komm (26+). Die Äthanollösung wird dabei bandförmig auf die Platte aufgetragen. Als Fließmittel wird Diäthyläther, Aceton, Dioxan, Ammoniak (30 : 30 : 30 : 10) verwendet.
3. Ein Streifen der Platte wird abgeschnitten und mit 1 % HgNO_3 -Lösung besprüht. Die barbiturathaltigen Streifen werden im UV-Licht markiert. Das Kieselgel dieser Streifen wird mit einem Spatel getrennt abgekratzt und in 10 ml Reagenzgläser gegeben.
4. Zum Kieselgel werden jeweils 5 ml Aceton hinzugefügt. Es wird 5 Minuten maschinell geschüttelt und anschließend 2 Minuten zentrifugiert. Der Acetonextrakt wird in ein spitz zulaufendes Röhrchen abgegossen und auf einem Wasserbad bei 70°C eingedampft.
Der Rückstand wird in 30 μl TMAH-Lösung aufgenommen.
1 μl dieser Lösung wird in den GC injiziert.

c) Gaschromatographische Bedingungen

Gaschromatograph: Fraktometer F 20 mit FID von Perkin Elmer

Säule: 2,20 m lange Glassäule, 2,5 mm I.D., 4 mm A.D.

Füllungsmaterial: 3 % OV-1 auf Gas Chrom Q, 100/120 mesh

Säulentemperatur: 165° C, bzw. 200° C

N₂-Strömungsgeschwindigkeit: 18 ml/Minute

Schreiber: Philips Schreiber, Papiergeschwindigkeit 0,7 cm/Min.

Die beschriebene Nachweismethode für Barbiturate und einige andere Verbindungen wurde an einer Reihe von gerichtsmedizinischen Fällen angewandt. Einige von diesen sind hier dargestellt.

Fall Nr. 1

Eine 47-jährige Frau war mit Vergiftungserscheinungen in ein Kreiskrankenhaus eingeliefert worden. Von dort bekamen wir Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung.

Durch Gaschromatographie wurde Aprobarbital im Urin nachgewiesen. Die Anwesenheit dieses Barbiturates wurde durch Dünnschichtchromatographie erhärtet. Die UV-spektrophotometrische Bestimmung ergab eine Barbituratkonzentration von 2,5 mg % im Urin.

Siehe Abb. 2

Fall Nr. 2

Ein 33-jähriger Mann verursachte einen Verkehrsunfall. Er wirkte betrunken. Er gab an, am Vortag 2 Kopfschmerztabletten eingenommen zu haben. Es wurde Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung genommen.

Der Alkoholgehalt des Blutes betrug 0,95 ‰.

Gaschromatographisch wurde im Urin Allobarbital nachgewiesen.

Die Identifizierung wurde durch Dünnschichtchromatographie, die auch noch basische Substanzen aufdeckte, bestätigt.

Siehe Abb. 3

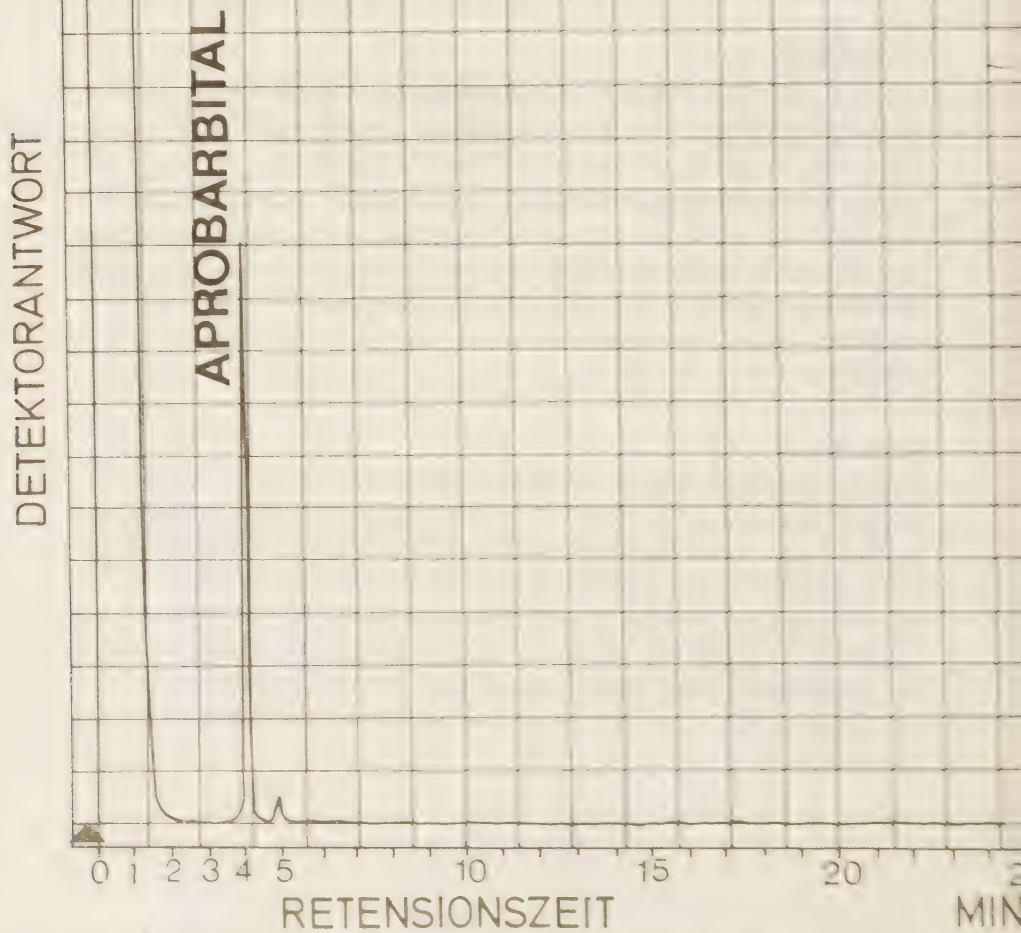


Abb. 2: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Einnahme einer Überdosis von Aprobarbital. Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1/16.

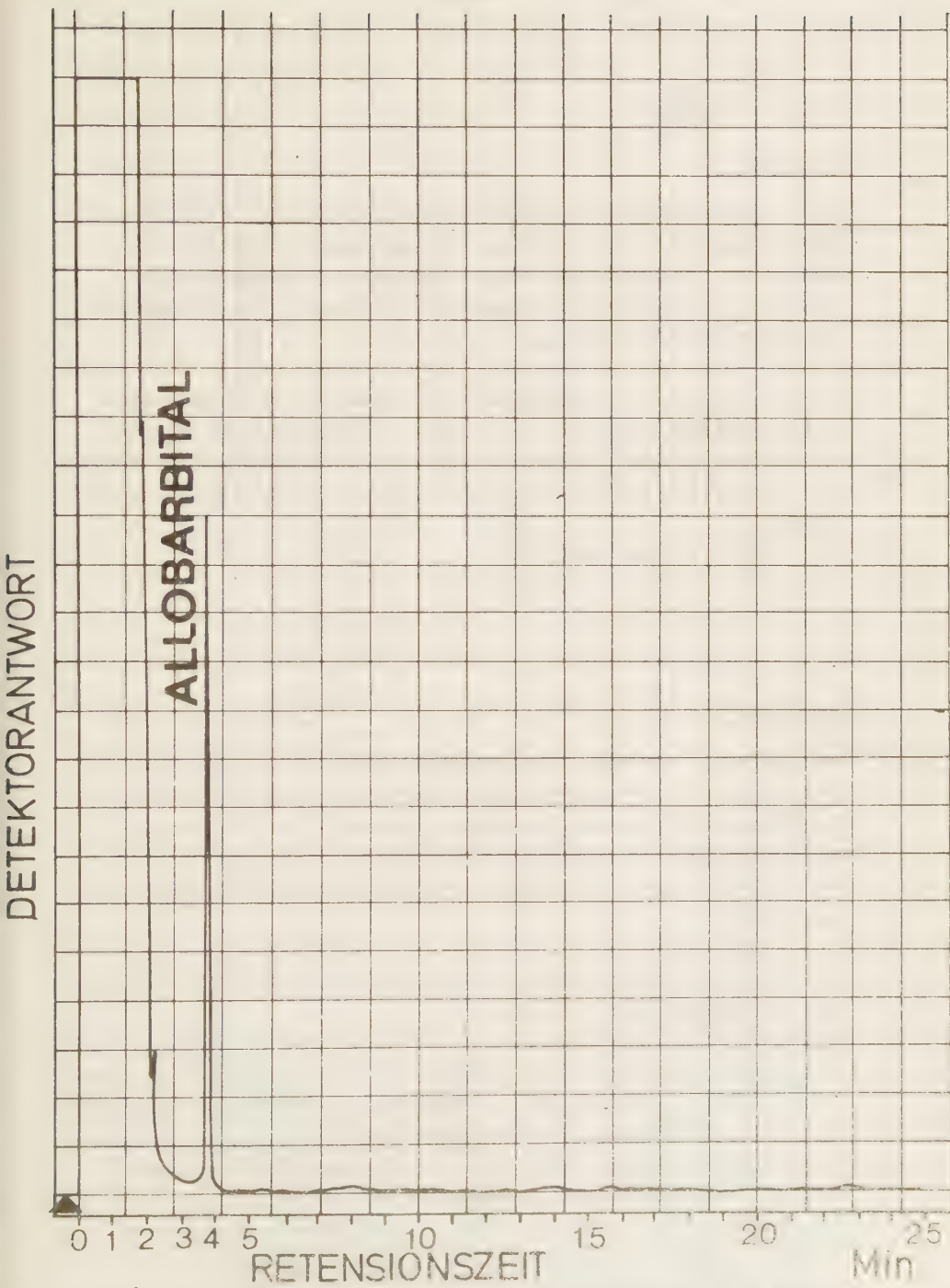


Abb. 3: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Anwendung von Allobarbitalsäure.
Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1:1.

Fall Nr. 3

Eine junge Patientin lag mit einer Hepatitis in einer Universitätsklinik. Wegen Verdachts auf Rauschgiftmißbrauch wurde Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung geschickt. 8 Tage später bekamen wir nochmals eine Urinprobe zur Kontrolluntersuchung.

Im Urin wurde gaschromatographisch neben Coffein Phenobarbital nachgewiesen. Bei einer Kontrollanalyse nach 8 Tagen fanden wir dieses Barbiturat nur noch in ganz geringer Menge. Die Extraktion wurde beide Male mit 50 ml Chloroform ausgeführt.

Siehe Abb. 4 A und Abb. 4 B.

Fall Nr. 4

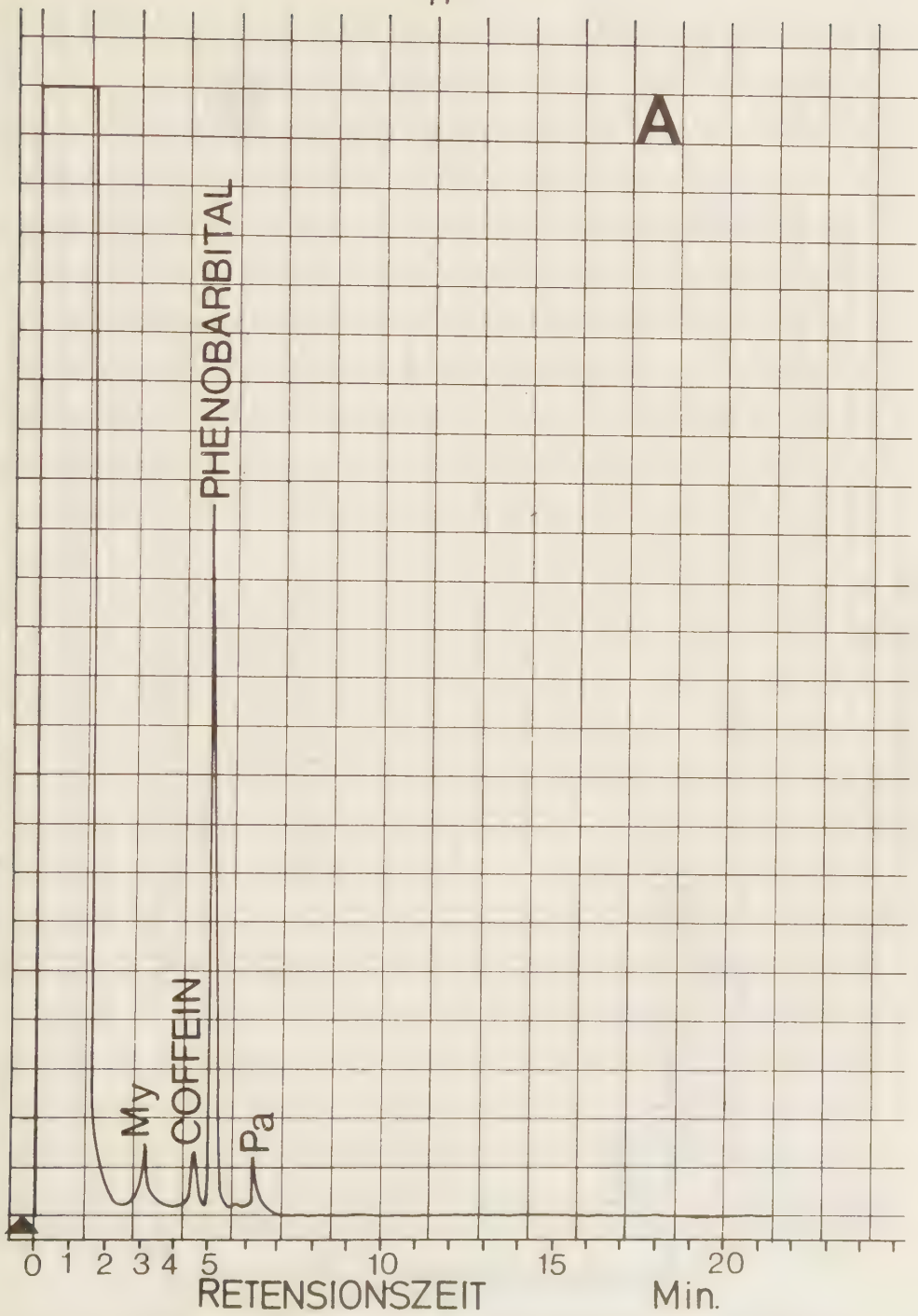
Ein Patient, der als Epileptiker bekannt war, wurde bewußtlos in eine Universitätsklinik eingeliefert und erlangte dort mehrere Tage das Bewußtsein nicht. Er sollte regelmäßig Primidon in therapeutischer Dosis eingenommen haben. Es wurde uns Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung geschickt.

Die gaschromatographische Analyse ergab Anwesenheit von Methylphenobarbital im Urin.

Neil sich bei Methylierung Phenobarbital und Methylphenobarbital nicht trennen lassen, haben wir zusätzlich den Urinextrakt und eine Testlösung mit Methylphenobarbital in nicht methyliertem Zustand chromatographiert und damit die Identifizierung gesichert. Nach dem Erwachen bestätigte der Patient, Prominal[®], dessen Wirkstoff Methylphenobarbital ist, in Überdosis in suizidaler Absicht eingenommen gehabt zu haben.

Siehe Abb. 5 A, Abb. 5 B, Abb. 5 C und Abb. 5 D.

DETEKTORANTWORT



b. 4 A: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Einnahme von Phenobarbital und Coffein. My = Myristinsäure, Pa = Palmitinsäure; Säulen-

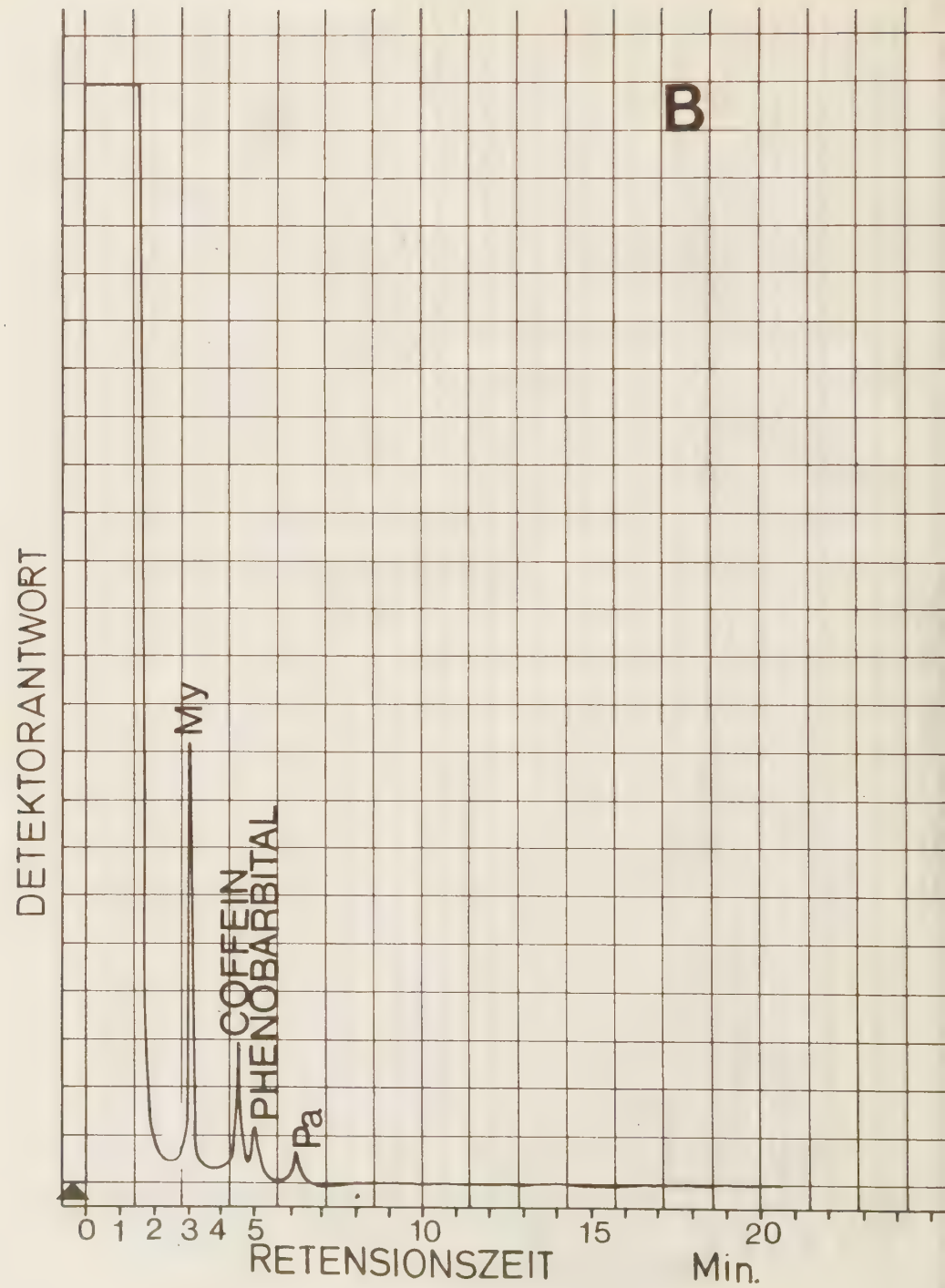


Abb. 4 B: Gaschromatogramm des Urinextraktes der gleichen Patientin wie bei 4 A 8 Tage später.

DETEKTORANWORT

METHYLPHENOBARBITAL, meth. (URIN)

A

RETENSIIONSZEIT

Min.

b. 5 A: Gaschromatogramm des methylierten Urinextraktes nach Einnahme einer Überdosis an Methylphenobarbital. Säulentemperatur 200°C, Abschwächung 1 (bei 5 A - D).

DETEKTORANTWORT

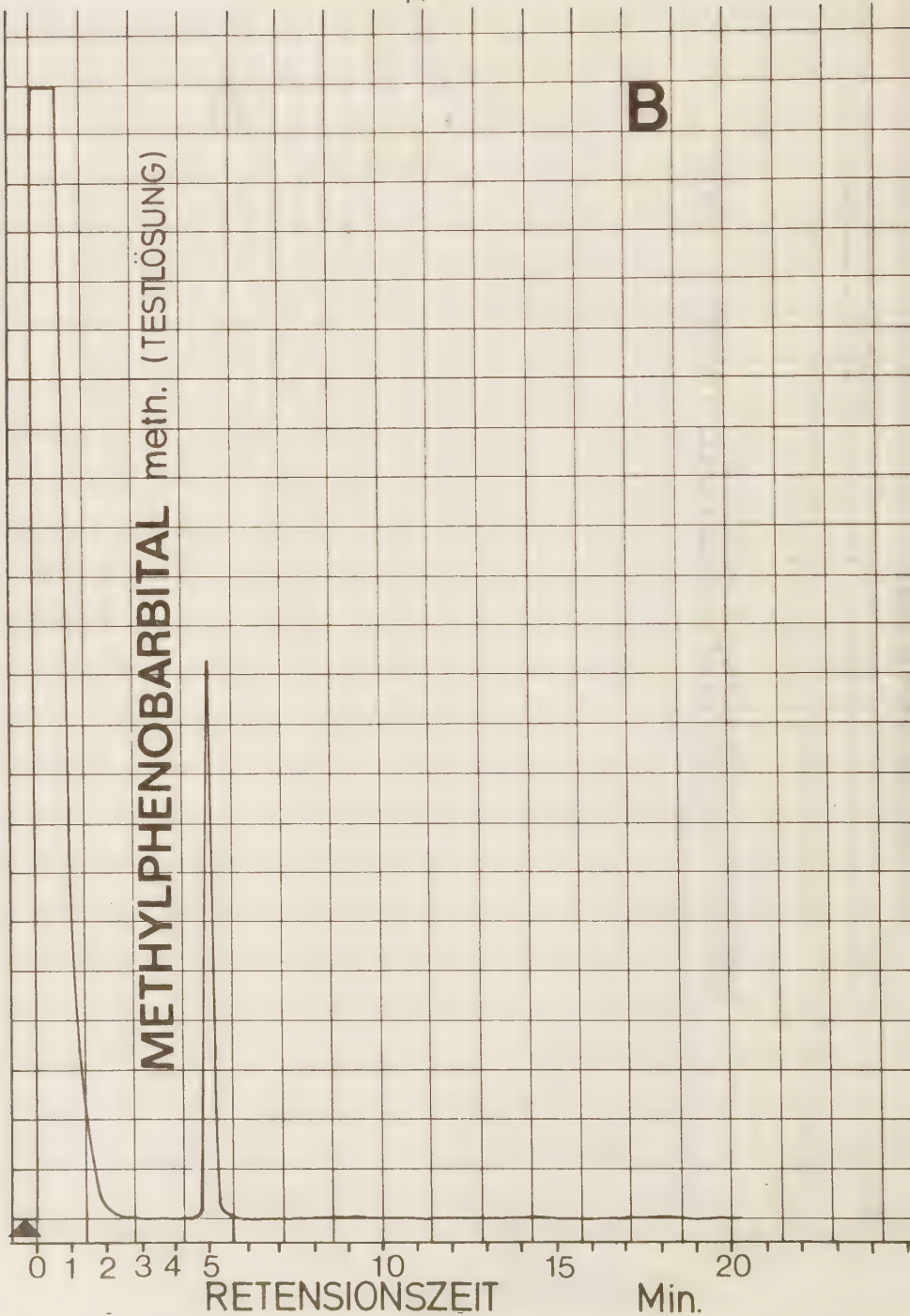


Abb. 5 B: Gaschromatogramm der methylierten Testlösung mit Methylphenobarbital.

DETEKTORANTWORT

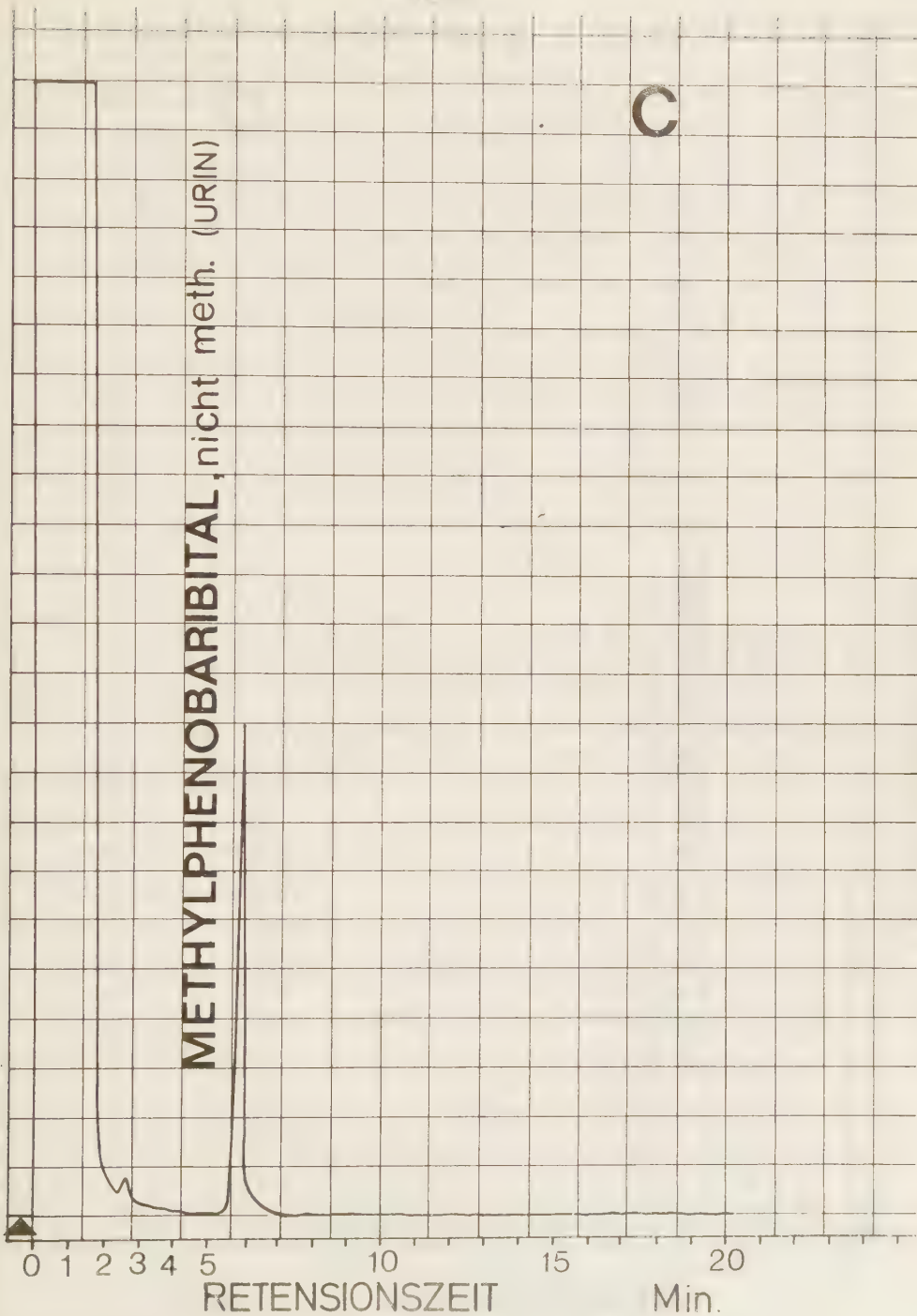


Abb. 5 C: Gaschromatogramm des nicht meth. Phenobarbital im Urin eines Patienten wie bei

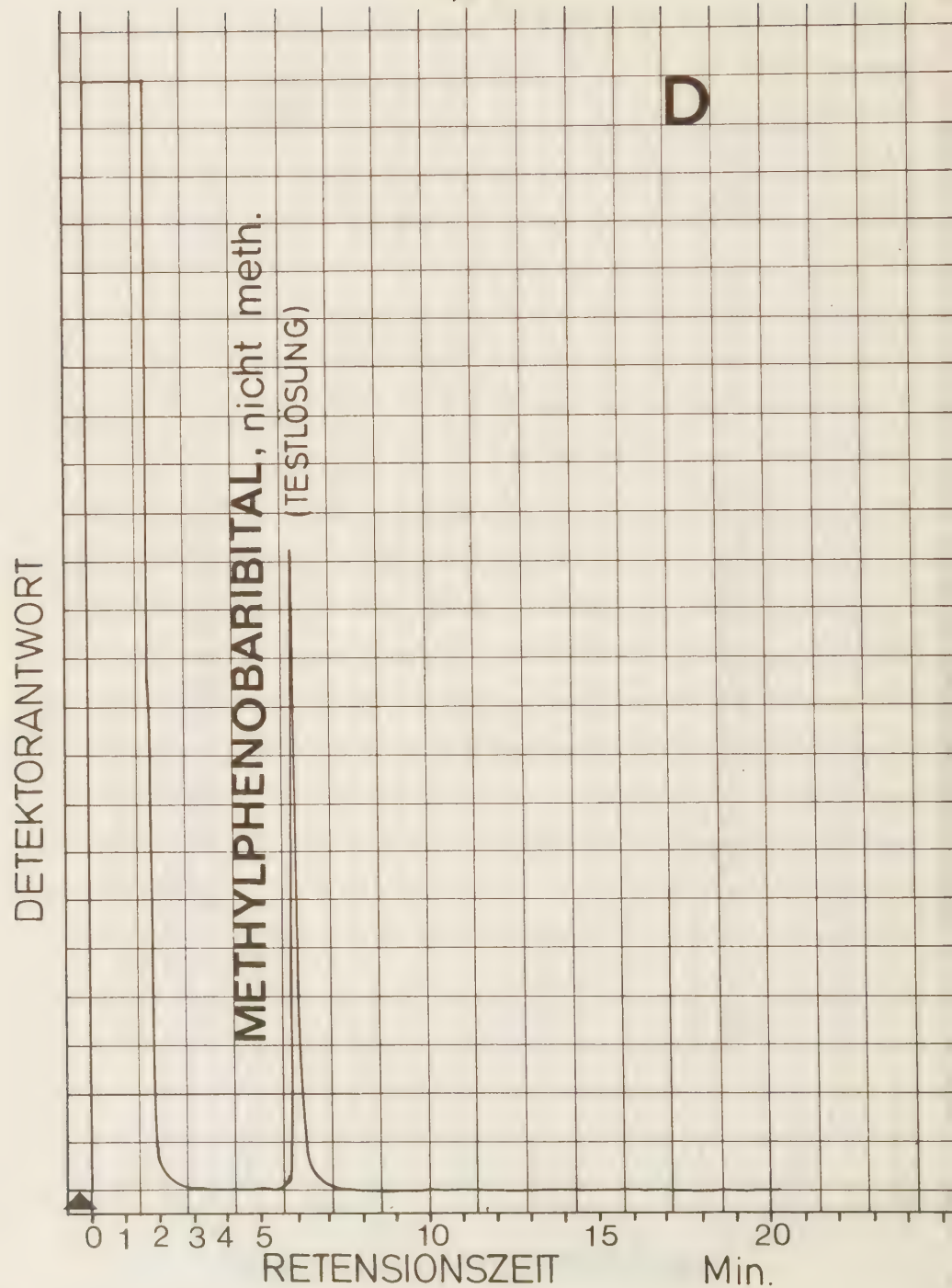


Abb. 5 D: Gaschromatogramm der nicht methylierten Testlösung mit Methylphenobarbital.

Fall Nr. 5

Ein Mann mittleren Alters verursachte hintereinander 2 Verkehrsunfälle. Er wirkte stark betrunken, konnte aber noch angeben, 10 Tabletten Noludar[®] eingenommen zu haben. Er wurde ins Krankenhaus eingeliefert, und von dort bekamen wir Blut und Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung.

Es wurde ein Blutalkoholgehalt von 1,3 ‰ festgestellt.

Durch Gaschromatographie wurde Methyprylon, der Wirkstoff von Noludar[®], und Metaboliten im Urin aufgedeckt. Zur Erhärtung der Identifizierung haben wir den Urinextrakt und die Testlösung mit Methyprylon in nicht derivatisiertem Zustand zusätzlich chromatographiert.

Siehe Abb. 6 A, Abb. 6 B, Abb. 6 C und Abb. 6 D.

Fall Nr. 6

Ein 49-jähriger Mann, der als Bierfahrer beschäftigt war, fiel durch seine verkehrswidrige Fahrweise auf. Polizeibeamte veranlaßten eine Blutalkoholbestimmung. Da der Mann angab, regelmäßig Medikamente gegen Asthma bronchiale einzunehmen, wurde eine Urinprobe zur chemisch-toxikologischen Untersuchung genommen.

Der Blutalkoholgehalt betrug 1,49 ‰.

Die Gaschromatographie ergab Anwesenheit von Glutethimid und Phenobarbital im Urin - 2 Wirkstoffe, die in den üblichen Asthmamitteln nicht enthalten sind. Durch Dünnschichtchromatographie konnte die Analyse bestätigt werden. Daneben entdeckten wir noch zahlreiche basische Substanzen bei der DC. Siehe Abb. 7

DETEKTORANTWORT

METHYPRYLON (URIN), meth.

A

0

1

2

3

4

5

10

15

2

25

RETENSIIONSZEIT

Min.

4: Gaschromatogramm des methylierten Urinextraktes nach Einnahme einer Überdosis an Methyprylon. Säulentemperatur 165°C , Abschwächung 1/16 (bei 6 A-D).

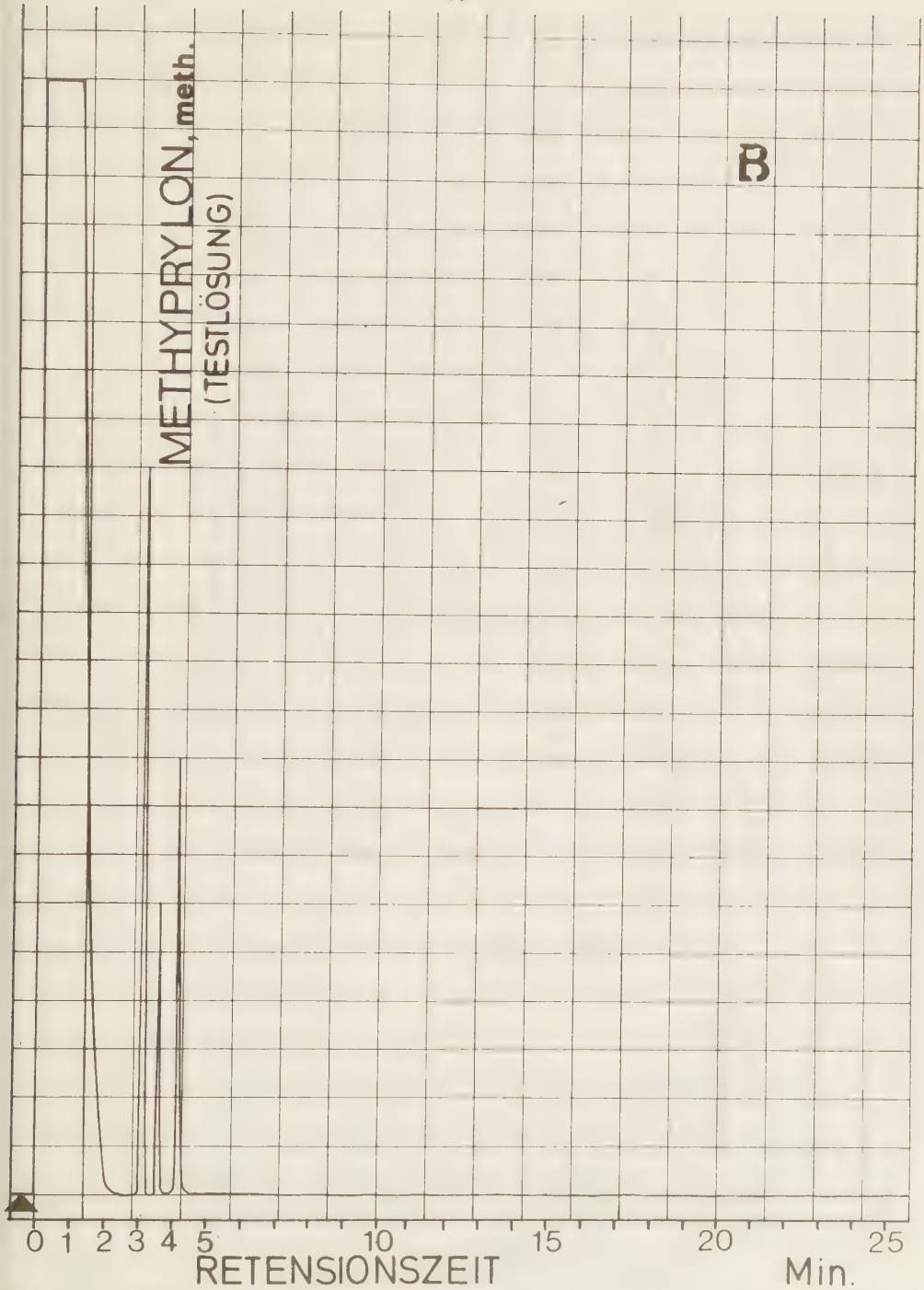


Abb. 6 B: Gaschromatogramm der methylierten Testlösung mit Methyprylon.

DETEKTORANTWORT

METHYPRYLON (URIN), nicht meth.

C

0 1 2 3 4 5 10 15 20 25
RETENSIIONSZEIT Min.

Abb. 6 C: Gaschromatogramm des nicht methylierten Urinextraktes des gleichen Patienten wie bei 6 A.

DETEKTORANTWORT

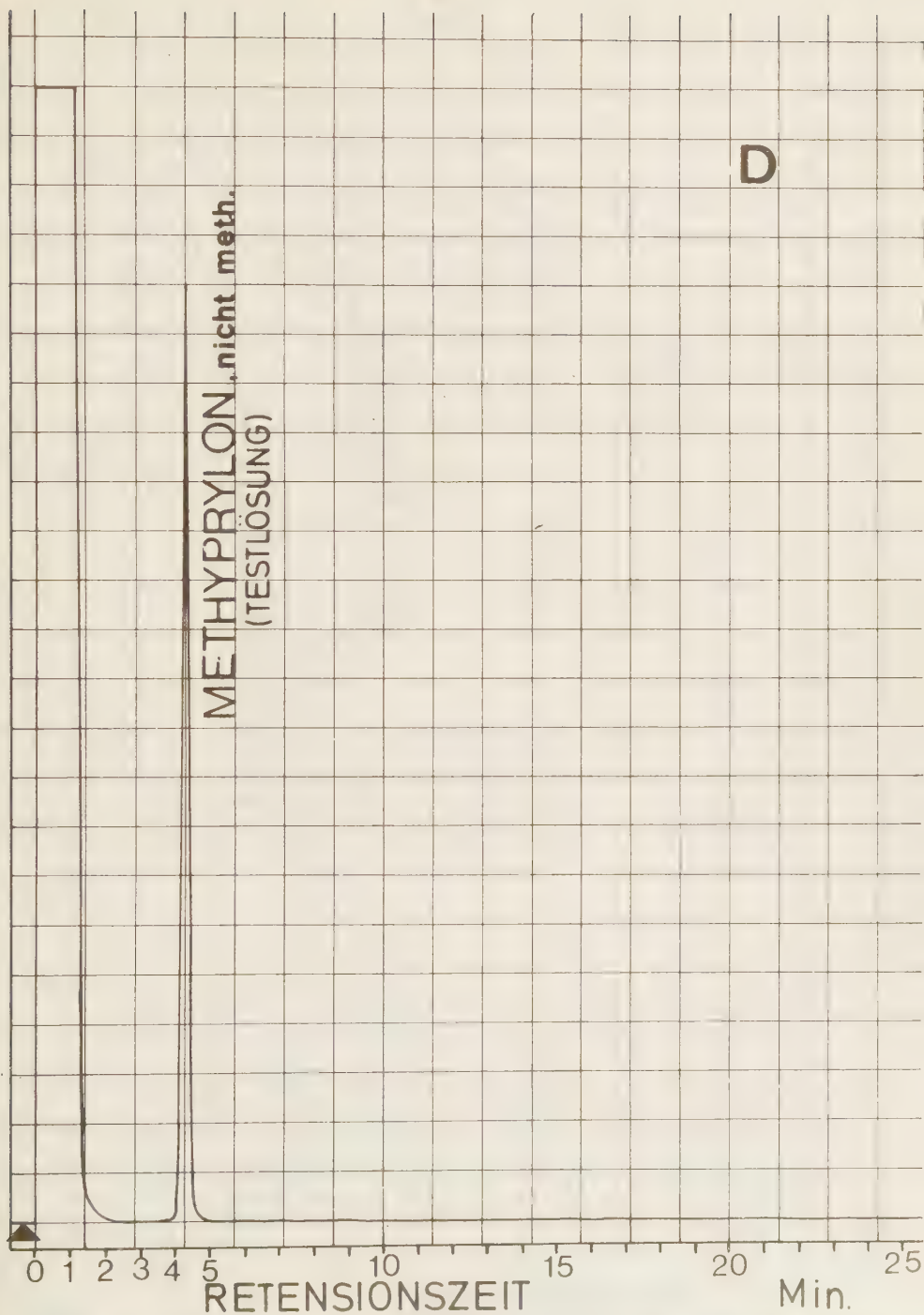


Abb. 6 D: Gaschromatogramm der nicht methylierten Testlösung mit Methyprylon.

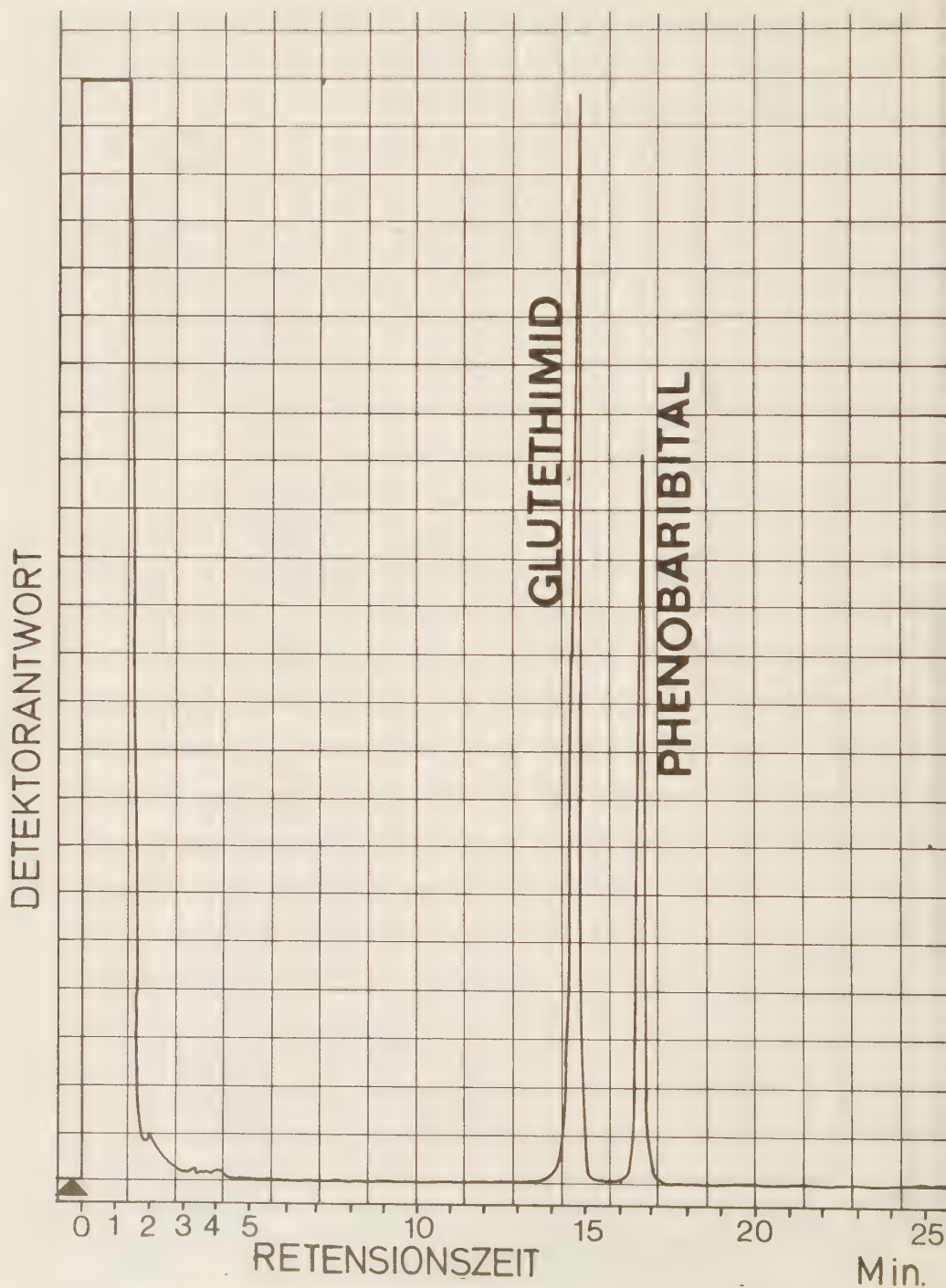


Abb. 7: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Einnahme von Phenobarbital und Glutethimid. Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1/4.

Fall Nr. 7

Von einer jungen Krankenschwester, die unter Verdacht von Drogenabusus stand, wurde eine Urinprobe zur chemisch-toxikologischen Untersuchung geschickt.

Im Gaschromatogramm des Urinextraktes zeigten sich Phenobarbital und Coffein. Bestätigung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, die daneben noch körperfremde, basische Substanzen aufdeckte. Die Extraktion war mit 50 ml Chloroform ausgeführt worden.

Siehe Abb. 8

Fall Nr. 8

Ein 32-jähriger Mann verursachte einen Verkehrsunfall und flüchtete danach. Am gleichen Tag erfolgte Blut- und Urinprobe zur Alkoholbestimmung und chemisch-toxikologischen Untersuchung. Der Mann hatte angegeben, am Vortag 3 - 4 Stück Bellerгал[®] und 2 Stück Vivimed[®] eingenommen zu haben.

Äthanol wurde im Blut nicht nachgewiesen.

Durch gaschromatographische Analyse des Urins wurde die Anwesenheit von Phenobarbital, Coffein und Methaqualon festgestellt. Wir hatten mit 50 ml Chloroform extrahiert. Auch bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung wurden diese Arzneistoffe nachgewiesen. Die UV-Spektrophotometrie ergab eine erhebliche Barbituratkonzentration im Blut. Coffein und Phenobarbital sind Wirkstoffe der obigen Arzneimittel.

Siehe Abb. 9.

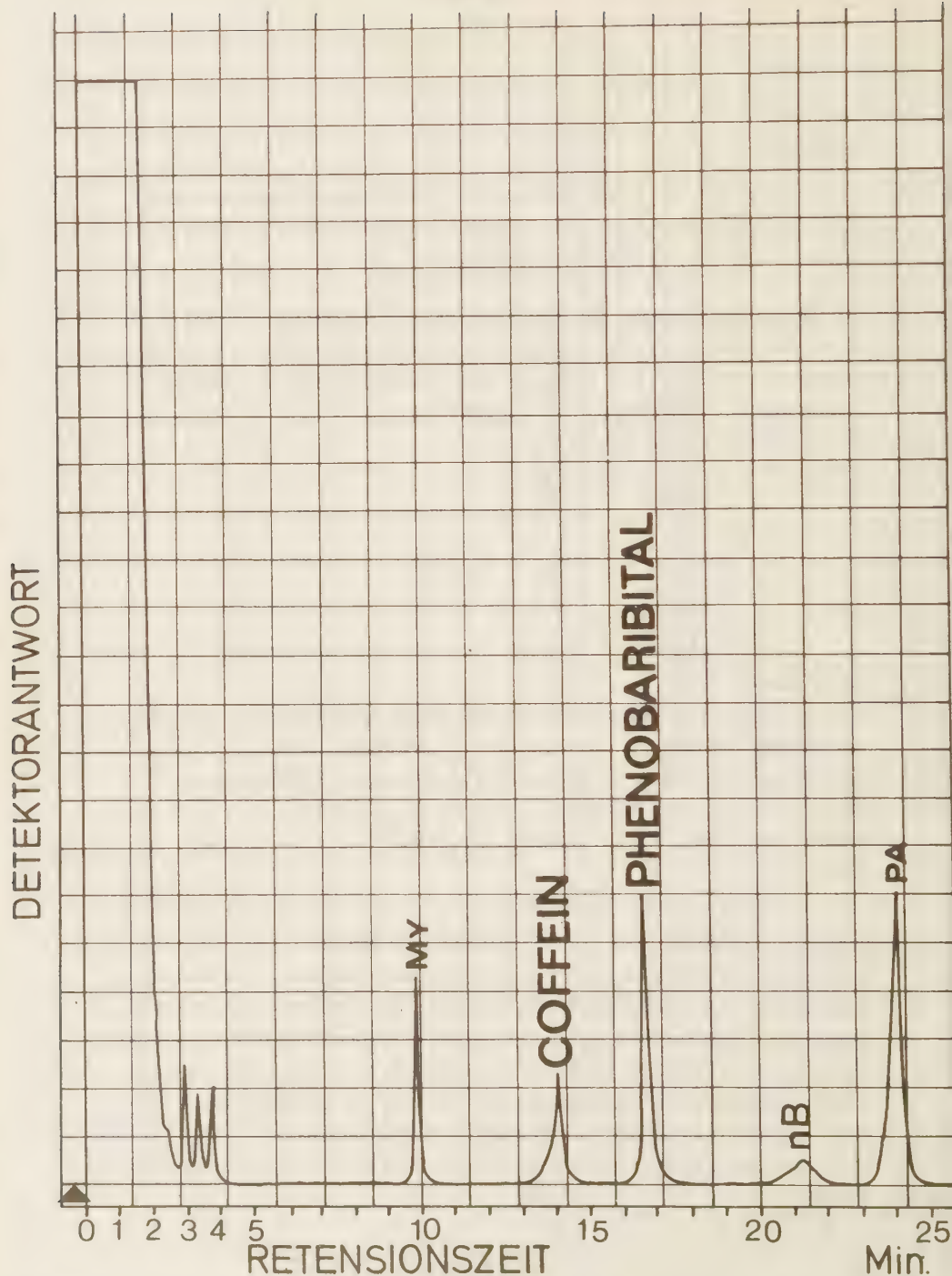


Abb. 8: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Einnahme von Phenobarbital und Coffein. My = Myristinsäure, Pa = Palmitinsäure, nB = natürlicher Bestandteil des Urins (nicht identifiziert). Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1.

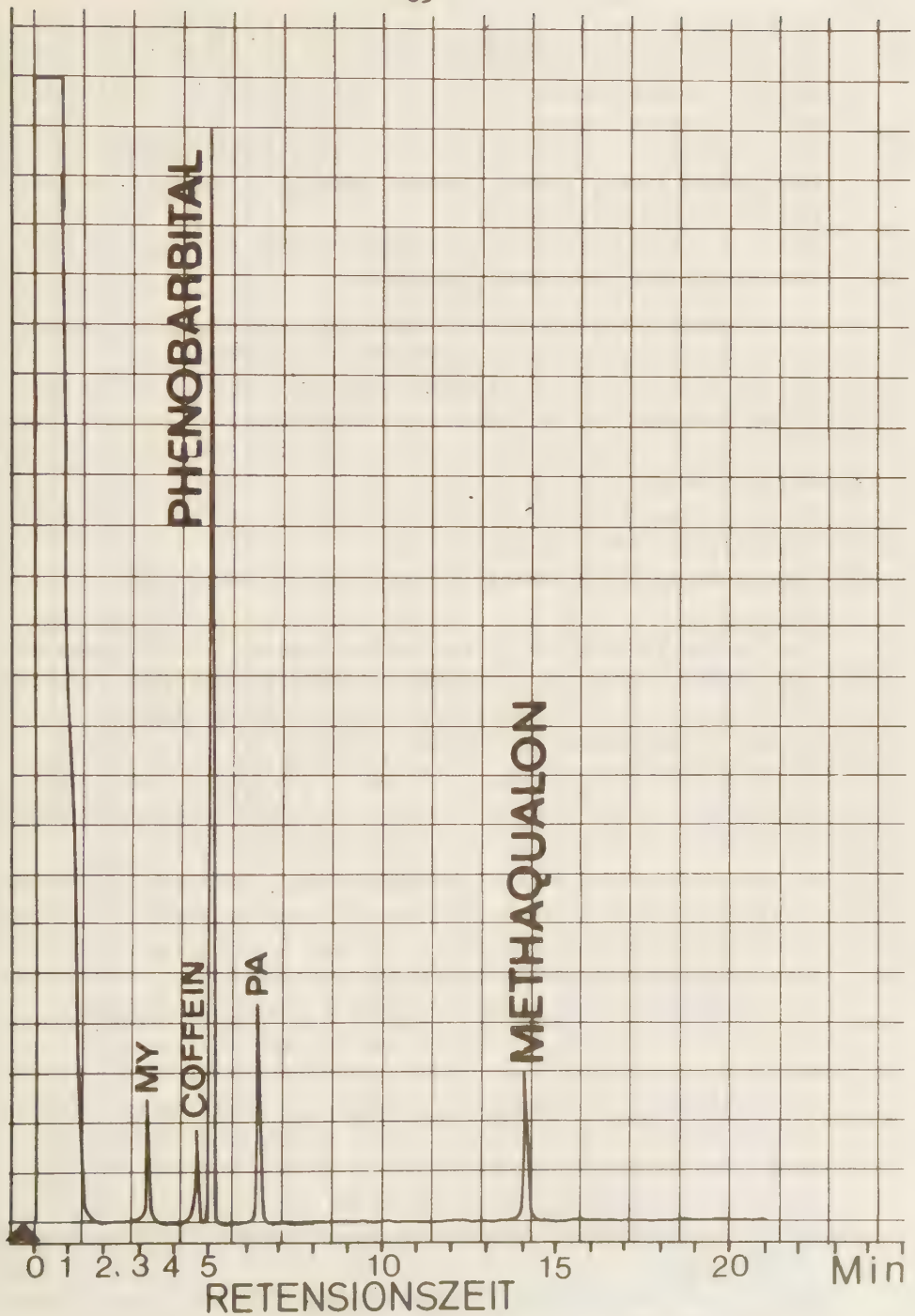


Abb. 9: Gaschromatogramm des Urinextraktes nach Einnahme von Phenobarbital über die therapeutische Dosis. Daneben Coffein und Methaqualon. My = Myristinsäure, Pa = Palmitinsäure. Säulentemp. 200°, Abschw. 1/16

Fall Nr. 9

Ein 19-jähriger Chemielaborant wurde tot in seinem Zimmer aufgefunden. Dem Hausarzt war der Jugendliche als arzneimittelsüchtig bekannt gewesen.

Bei der Obduktion zeigten sich zahlreiche Injektionsstellen entlang der großen Venen. Als Todesursache wurde ein hämorrhagisches Lungenödem festgestellt.

Proben von Blut, Urin und Mageninhalt wurden zur chemisch-toxikologischen Untersuchung gegeben.

Durch Gaschromatographie wurde Barbital in großer Menge in den Körperflüssigkeiten und im Mageninhalt nachgewiesen.

Bei der dünnstschichtchromatographischen Untersuchung wurde die Identifizierung des Barbitals bestätigt. Daneben fand man noch andere saure sowie neutrale und basische körperfremde Stoffe in geringer Menge.

Die UV-spektrophotometrische Bestimmung zeigte eine Barbituratkonzentration von 22,1 mg% im Blut.

Siehe Abb. 10 A und Abb. 10 B.

Fall Nr. 10

Ein 72-jähriger Mann wurde von Polizeibeamten tot in seinem Bett aufgefunden. Neben ihm lag seine Ehefrau, die mit Vergiftungserscheinungen in ein Krankenhaus eingeliefert wurde.

Bei der angeordneten gerichtlichen Sektion der Leiche konnte keine eindeutige Todesursache festgestellt werden. Die Alkoholbestimmung im Blut verlief negativ. Es wurden biologische Proben zur chemisch-toxikologischen Untersuchung gegeben.

Bei der Gaschromatographie des Mageninhalts wurden die Barbiturate, Cyclobarbitol und Pentobarbital, nachgewiesen. Im Blut und Urin wurde neben Cyclobarbitol, Barbital (wahrscheinlich ein Abbauprodukt des Pentobarbital) gefunden.

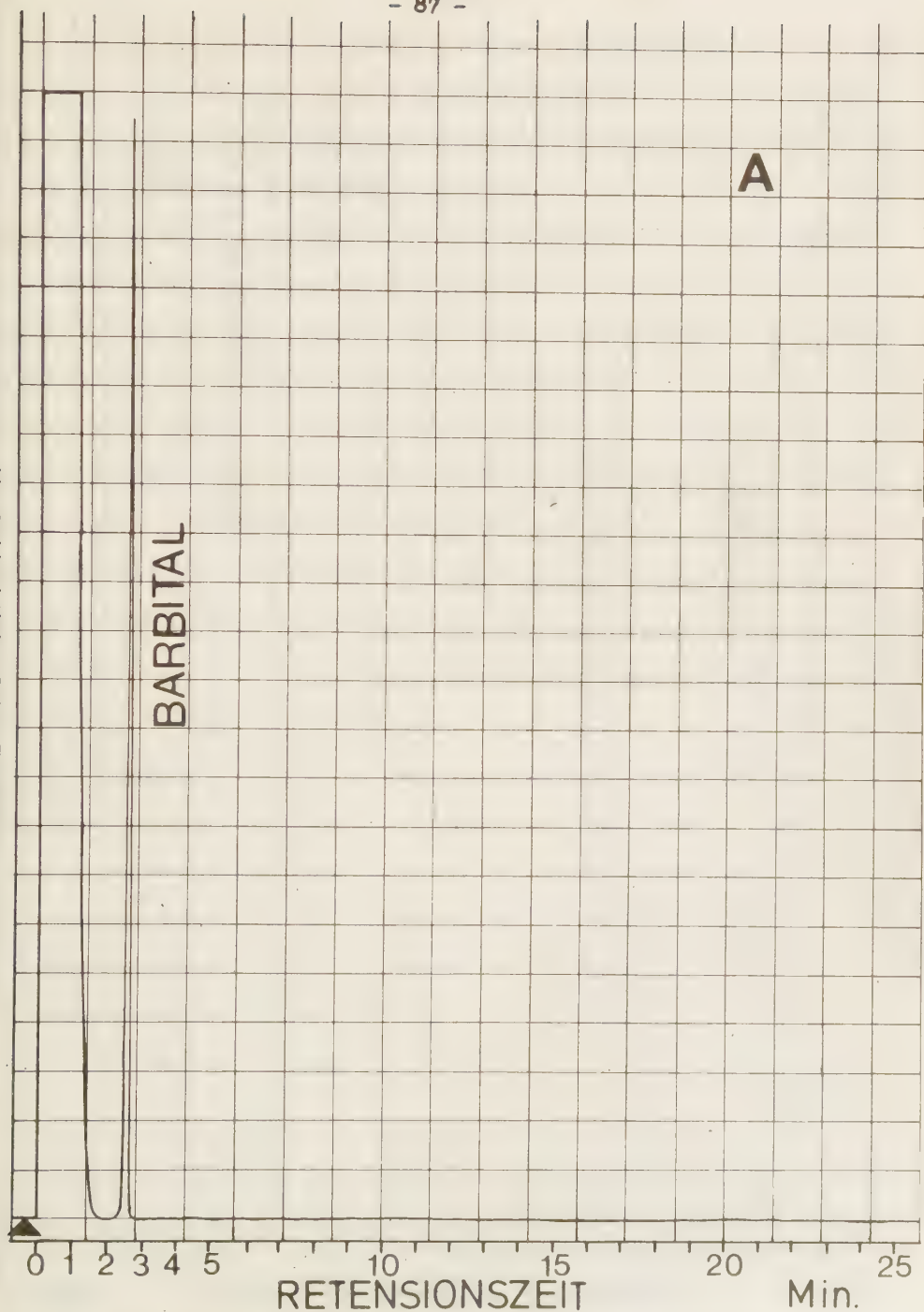
Die quantitative Bestimmung der Gesamtbarbiturate durch UV-Spektrophotometrie ergab eine Konzentration von 0,8 mg % im Blut.

Durch Dünnschichtchromatographie wurde die Anwesenheit der genannten Barbiturate in den biologischen Proben bestätigt. Mit verschiedenen Analyseverfahren wurden außerdem die Substanzen, Carbronal, Benactazin und Methaqualon, die Wirkstoffe des Sedativums Staudorm[®] darstellen, in den biologischen Proben nachgewiesen.

Der Tod war trotz niedriger Barbituratkonzentration mit großer Wahrscheinlichkeit infolge Potenzierung durch diese Schlafmittel eingetreten.

Siehe Abb. 11 A und Abb. 11 B.

DETEKTORANWORT



bb. 10 A: Gaschromatogramm des Blutextraktes nach Vergiftungstod durch Barbital. Säulentemp. 165°C, Abschwächung 1/16 (bei 10 A u. B).

DETEKTORANTWORT

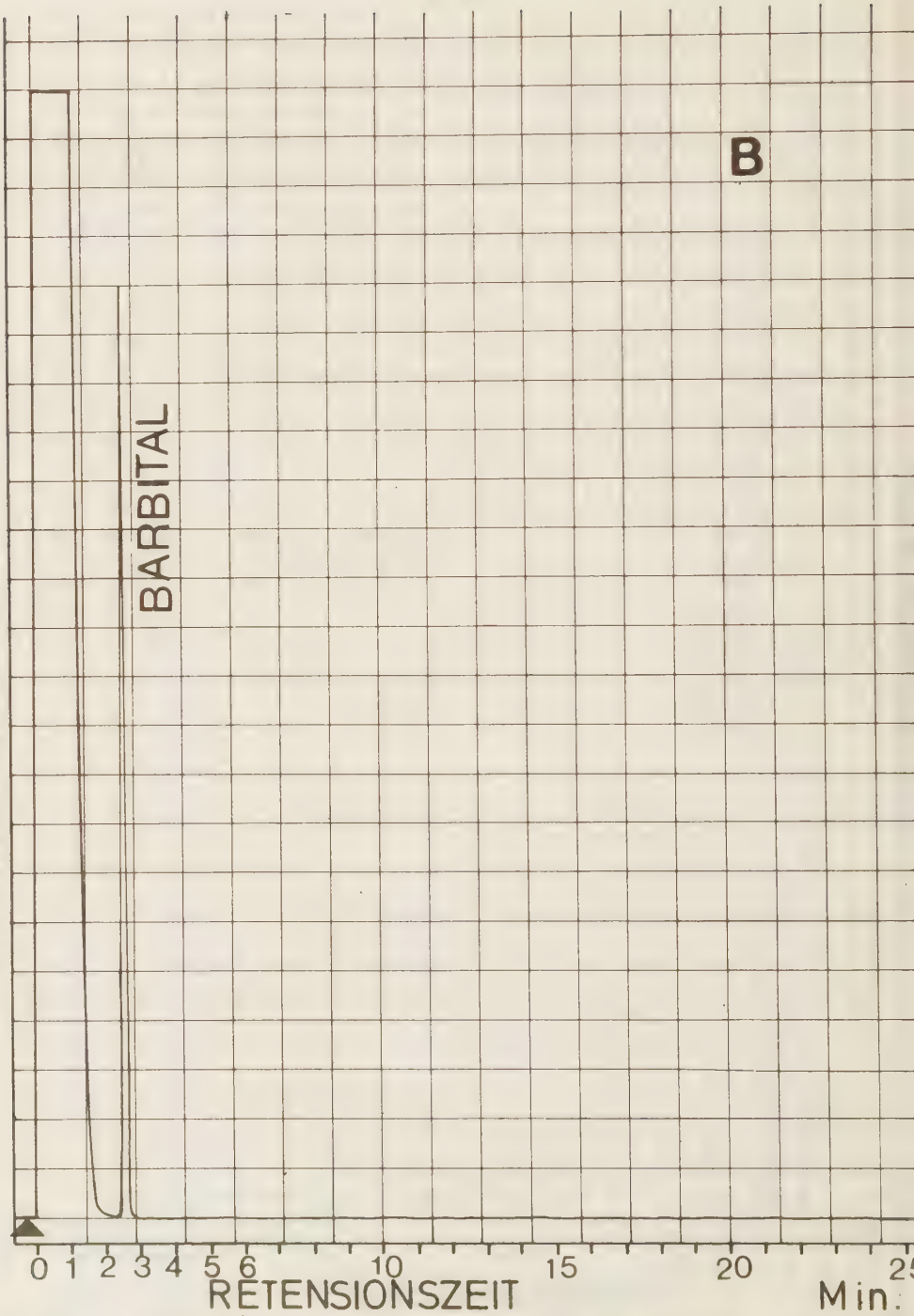
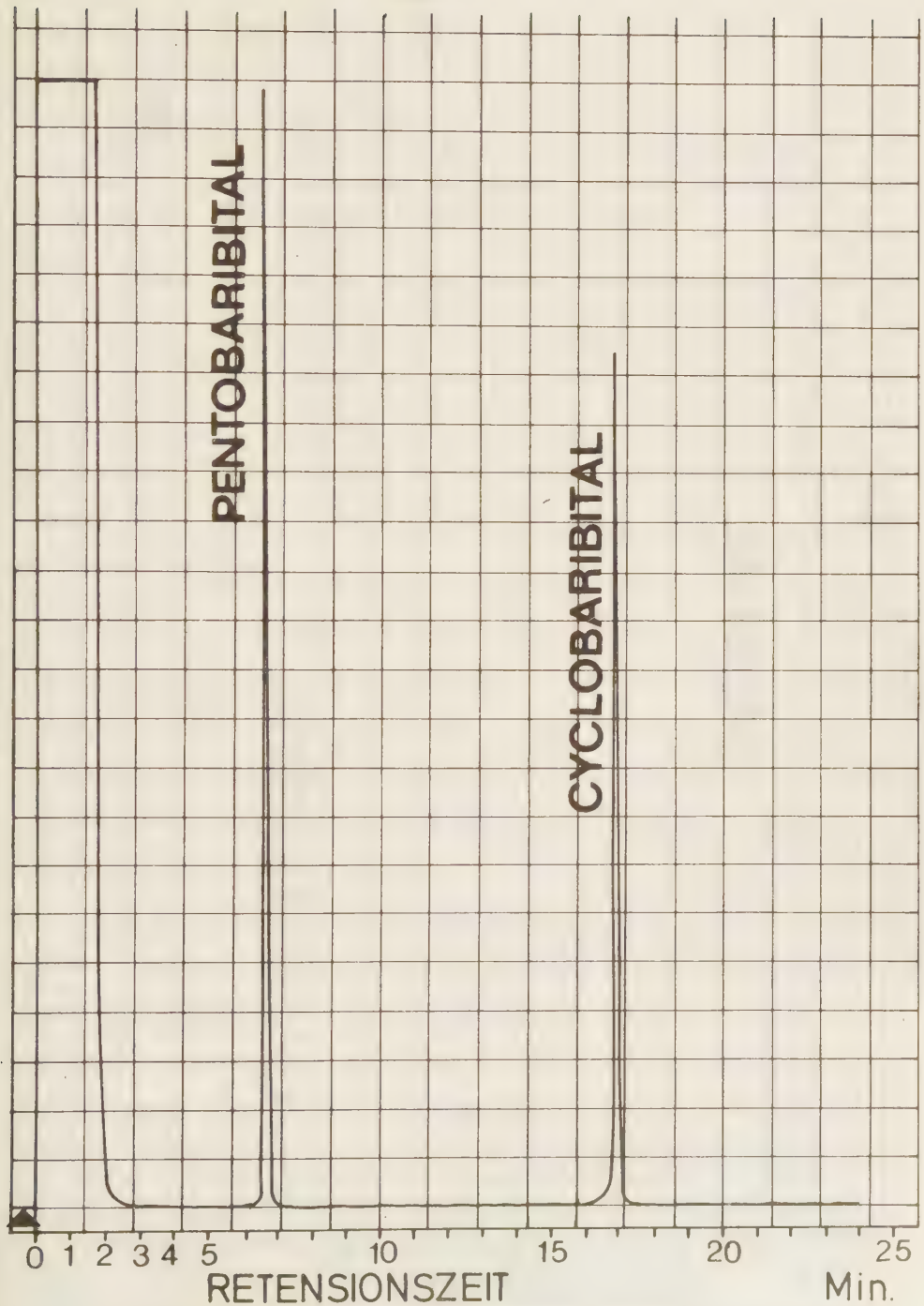


Abb. 10 B: Gaschromatogramm des Extraktes aus dem Mageninhalt der gleichen Leiche wie bei 10 A.

DETEKTORANTWORT



bb. 11 A: Gaschromatogramm des Extraktes aus Mageninhalt nach Vergiftungstod durch Cyclobarbital und Pentobarbital. Säulentemp. 165°C , Abschwächung 1 (bei 11 A und 11 B).

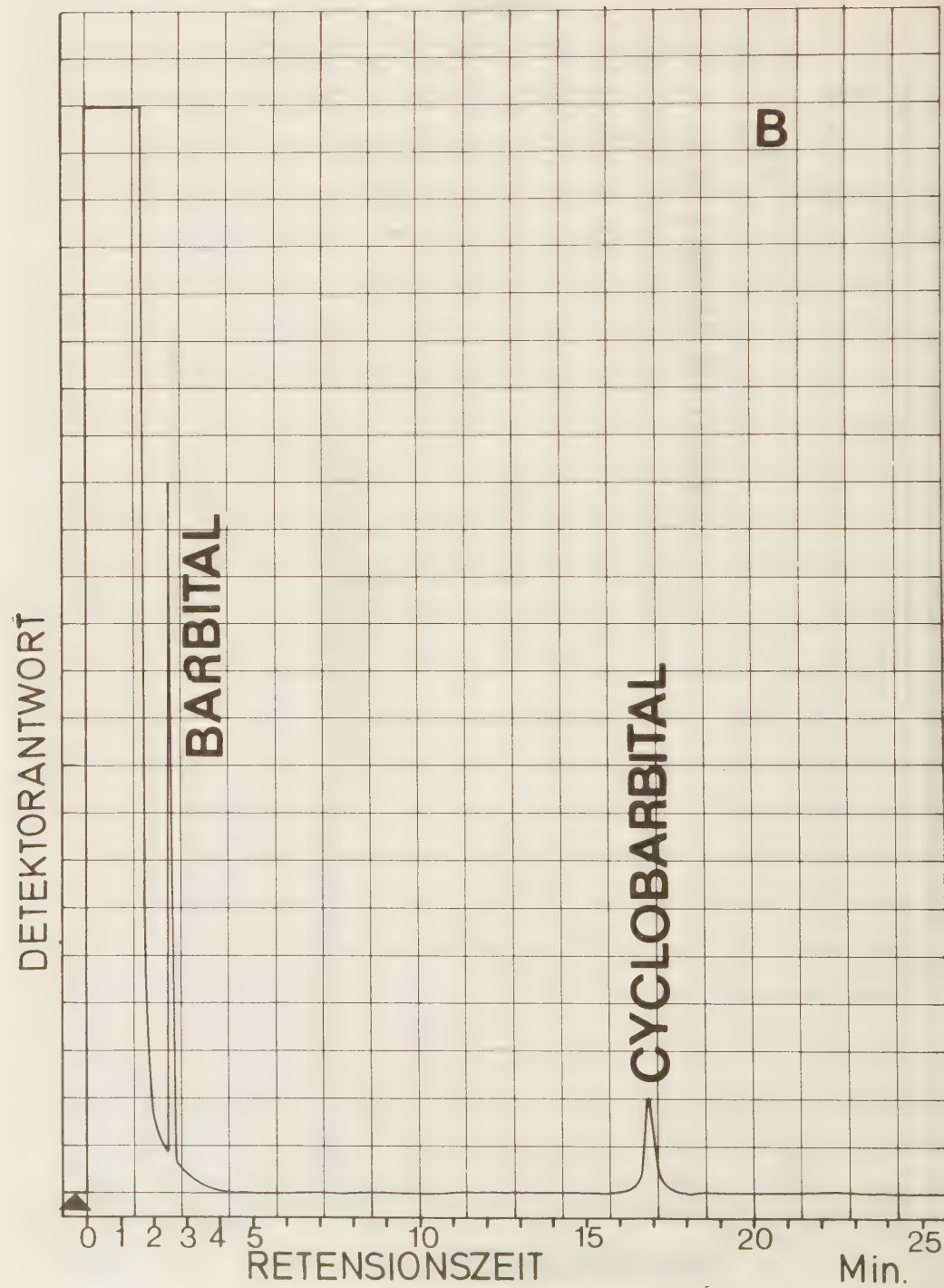


Abb. 11 B: Gaschromatogramm des Urinextraktes der gleichen Leiche wie bei 11 A.

Fall Nr. 11

Ein 70-jähriger Mann wurde tot im Wald aufgefunden. Es war bereits fortgeschrittene Leichenfäulnis und teilweise Skelettierung vorhanden. Der Inhalt des Magens, der noch Tablettenreste aufwies, wurde chemisch-toxikologisch untersucht.

Im Mageninhalt wurden die Barbiturate, Secobarbital und Brallobarbital, gaschromatographisch nachgewiesen. Brallobarbital erschien mit 3 Peaks. Bei Gaschromatographie einer alten Testlösung mit der Reinsubstanz von Brallobarbital zeigten sich ebenfalls drei Peaks. Es ist anzunehmen, daß sie durch Zerfallsprodukte des Brallobarbital hervorgerufen werden. Auf dem Gaschromatogramm des Extraktes dieses Mageninhalts trat ein Störpeak durch Palmitinsäure auf.

Brallobarbital und Secobarbital sind Wirkstoffe des Vesperax[®].
Siehe Abb. 12.

Fall Nr. 12

Ein Kind soll im Laufe des Tages zunehmend bewußtlos geworden sein und wurde dann in ein auswärtiges Krankenhaus eingeliefert. Zur Klärung des unklaren Krankheitsbildes wurde uns Magensaft und Urin zur chemisch-toxikologischen Untersuchung geschickt.

Durch Gaschromatographie wurde Pentobarbital im Magensaft nachgewiesen. Auf dem Gaschromatogramm des Urinextraktes wurde ein Peak gefunden, der dem Barbital entspricht (wahrscheinlich als Abbauprodukt des Pentobarbital).

Siehe Abb. 13 A und Abb. 13 B.

Anmerkung

Bei Anwesenheit von mehreren Verbindungen im Mageninhalt wurden die nach dünn-schichtchromatographischer Trennung erhaltenen Gaschromatogramme für die einzelnen Substanzen übereinander projiziert gezeichnet.

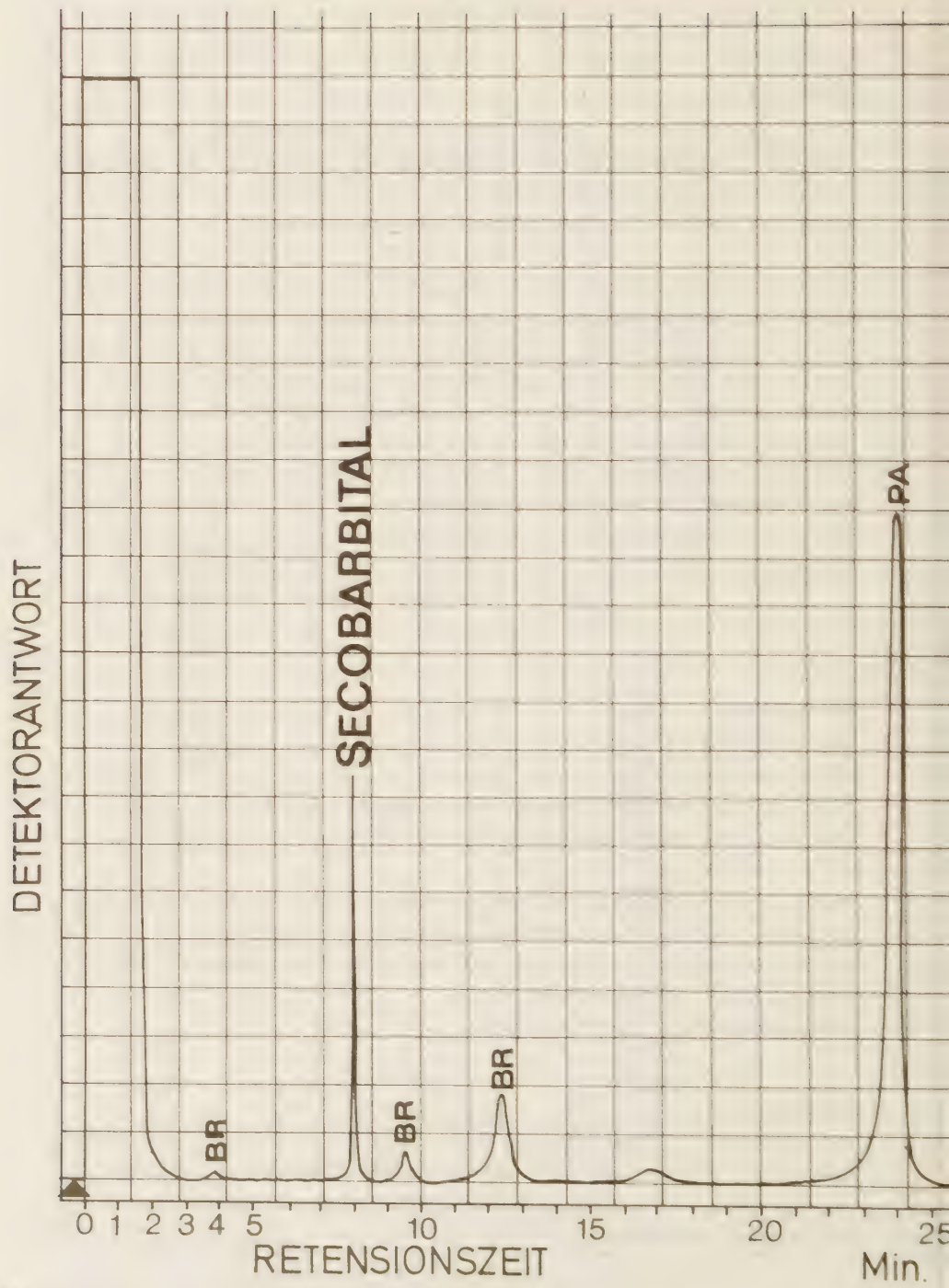


Abb. 12: Gaschromatogramm des Extraktes aus Mageninhalt nach Vergiftungs-
tod durch Secobarbital und Brallobarbital. Pa = Palmitinsäure,
Br = Brallobarbital. Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1.

DETEKTORANWURT

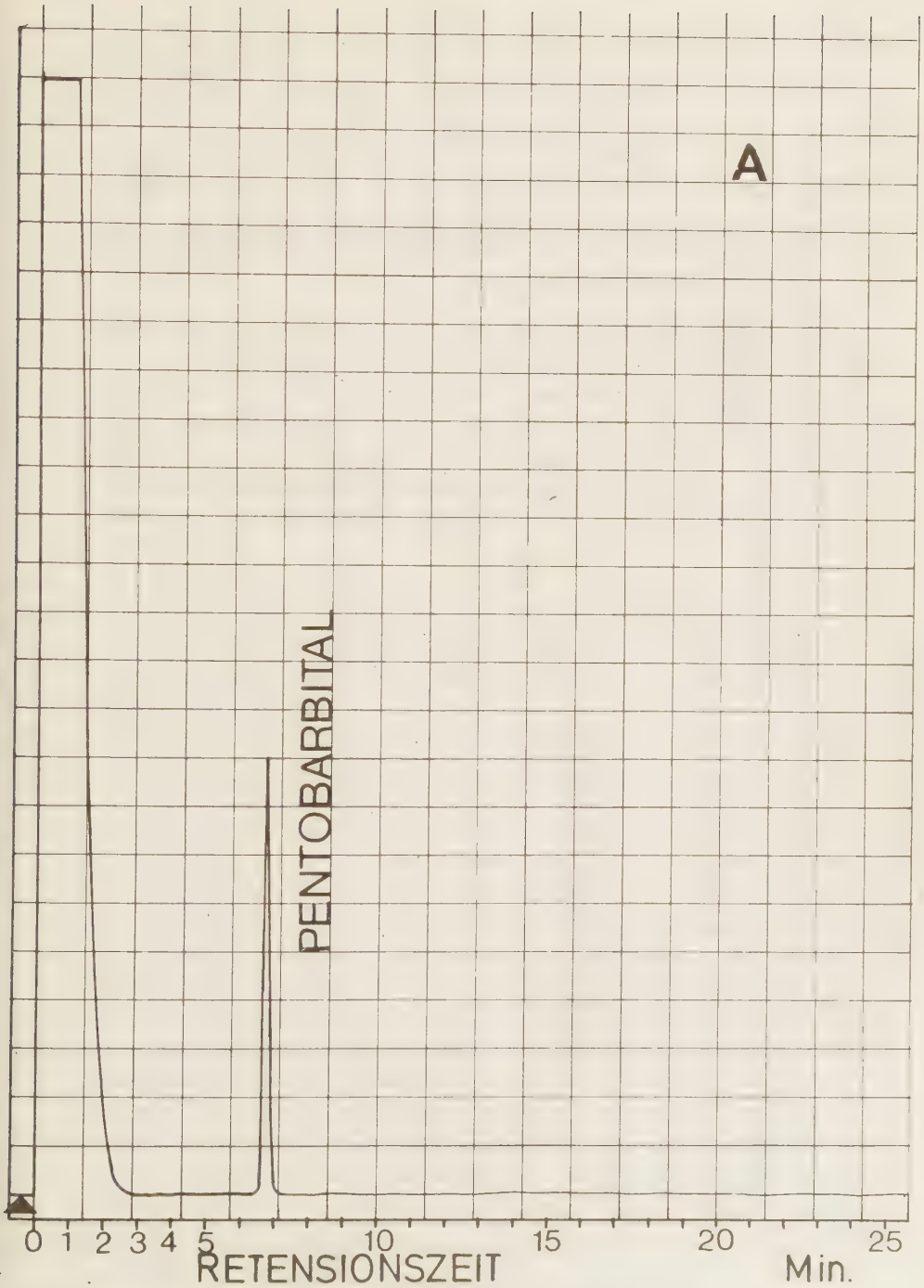


Abb. 13 A: Gaschromatogramm des Extraktes aus Mageninhalt nach Einnahme einer Überdosis von Pentobarbital. Säulentemperatur 165°C, Abschwächung 1/16 (bei 13 A und B).

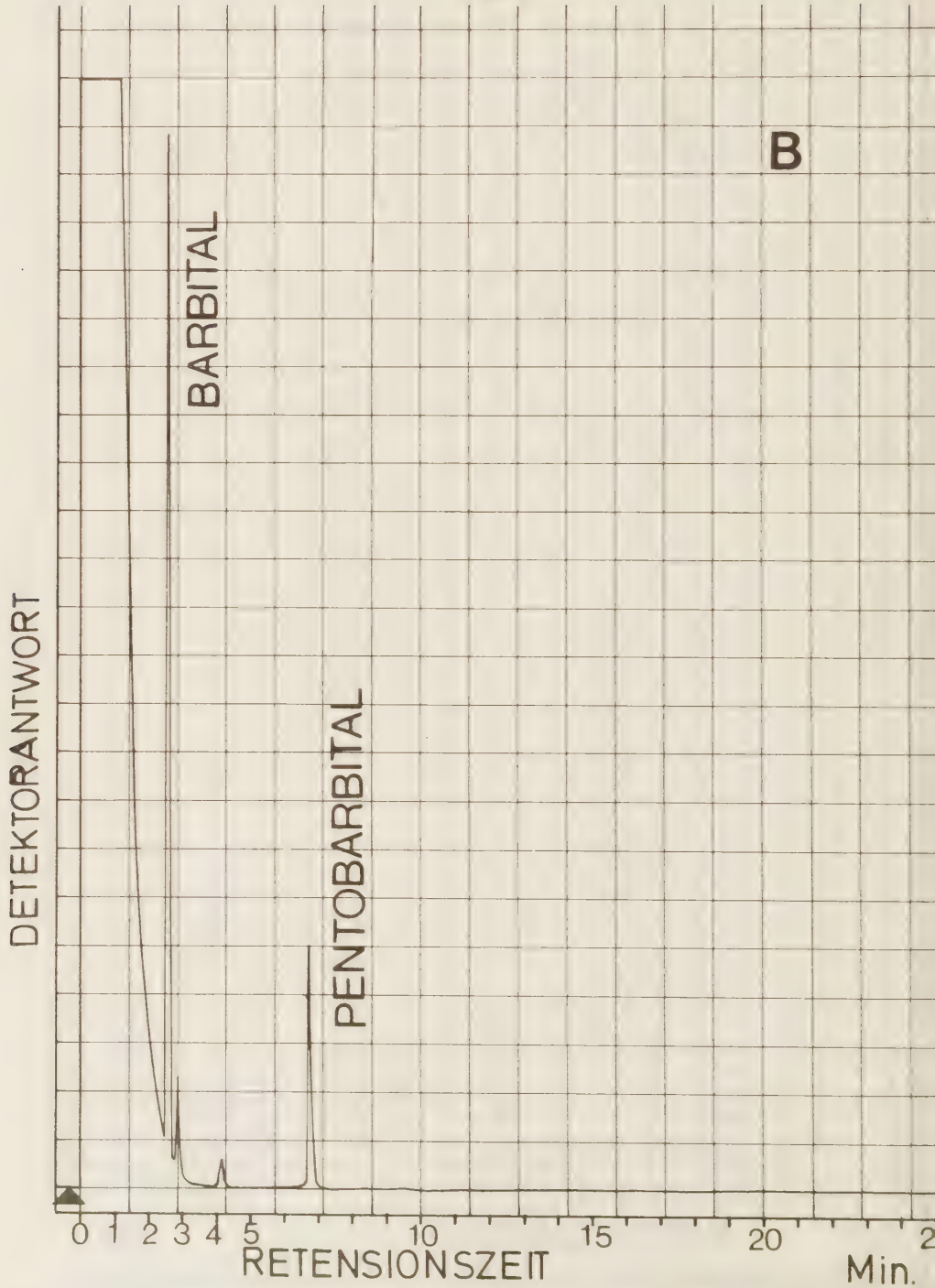


Abb. 13 B: Gaschromatogramm des Urinextraktes vom selben Fall wie bei 13

C. DISKUSSION

Gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten

Unsere erste Aufgabe in dieser Arbeit war, eine einfache, schnelle, genügend empfindliche und zuverlässige Methode zu finden, die eine optimale gaschromatographische Auftrennung eines breiten Bereichs von insgesamt 26 Barbituraten ermöglicht und die zur toxikologischen Routineuntersuchung geeignet ist. In der Literatur erschienene gaschromatographische Nachweismethoden für Barbiturate wurden unter diesen Gesichtspunkten betrachtet.

Zunächst haben wir uns mit den am häufigsten vorgeschlagenen Methoden der gaschromatographischen Auftrennung von Barbituraten ohne Derivatisierung beschäftigt. Von den Autoren wurde dabei immer wieder als Kernproblem die Adsorption der polaren Barbiturate an das Trägermaterial der Säule angeführt. Eine Reihe von Vorschlägen, um diese Adsorptionswirkung zu vermindern, sind gemacht worden. Die meisten Wissenschaftler entschieden sich für ein Verfahren mit Anwendung einer der nicht selektiven, unpolaren stationären Phasen, wie SE-30 (6,7,8,15,17,30,48), SE-52 (30,48,49), DC-200 (1,44), OV-1 (34) und QF-1 (19,20,32), in Kombination mit umfangreichen Spezialtechniken zur Deaktivierung des Trägermaterials. Es wird andererseits in der Literatur an mehreren Stellen darauf hingewiesen (13, 41), daß solche unpolaren Säulen trotz Vorbehandlung bei niedrigem Belegungsgrad oft starkes Tailing und schlechte Auflösung, bei hohem Belegungsgrad aber zu lange Retentionszeiten und starke Adsorption zur Folge hätten. Verbesserte Säulenfüllungsmaterialien sind entwickelt worden, und in der neueren Literatur ist über gute Ergebnisse bei der gaschromatographischen Auftrennung von Barbituraten mit mehr selektiven und polareren

stationären Phasen, wie OV-17 (26,27,37,50), XE-60 (28,34,41), Carbowax 20 M (30), PPE-20 (13,50), SP-1000 (13) Apiezon L (8,42) und Apiezon M (30), - vorzüglich mit niedrigem Belegungsgrad - berichtet worden. Die von den Autoren hervorgehobenen Vorteile dieser stationären Phasen, nämlich das gute Auflösungsvermögen für Barbiturate und das geringe Peak tailing, sowie die Schnelligkeit einer Methode ohne Derivatbildung haben uns veranlaßt, einige von diesen verbesserten stationären Phasen zu testen.

Wir wählten für unsere Versuche mit nicht derivatisierten Barbituraten die stationären Phasen - SP-1000, OV-17 sowie Apiezon M + Carbowax 20 M. Bei Gebrauch aller drei Säulen erschienen Peaks auf den Chromatogrammen mit nahezu symmetrischer Form und nur geringem Tailing, wie es auch in der Literatur angegeben ist. Im Gegensatz zu den Autoren, die über Auftrennung von nur wenigen Barbituraten berichteten, haben wir in unsere Untersuchungen insgesamt 26 Vertreter dieser Schlafmittel eingeschlossen. Bei bestimmten gaschromatographischen Bedingungen gelang die Aufdeckung aller 26 Barbiturate auf jeder der drei Säulen innerhalb einer zufriedenstellenden Zeit. Es zeigte sich jedoch, daß bei keiner der getesteten stationären Phasen die Auftrennung besonders günstig war, weil jeweils in einem bestimmten Bereich eine ganze Reihe von Barbituraten gleiche oder ähnliche Retentionszeiten aufwiesen und wichtige Verbindungen nicht voneinander getrennt werden konnten. Außerdem machten sich bei unseren Experimenten auch bei diesen verbesserten Säulenfüllungsmaterialien die Eigenschaften der polaren Barbiturate, an das Trägermaterial der Säule zu adsorbieren, bemerkbar. So bekamen wir oft erst nach mehrfachen Injektionen von Proben ein und desselben Barbiturates in den Gaschromatogrammen einen Peak auf dem Chromatogramm, nämlich erst dann, wenn die aktiven Gruppen am Trägermaterial "gesättigt" waren. Verunreinigung der Säule durch anhaftende Substanzen machten ein häufiges Konditionieren bzw. Aus-

wechseln der Säule nötig. Dieses Verfahren war deshalb zur routinemäßigen Anwendung nicht besonders geeignet und mangelte außerdem an Genauigkeit. Durch Ablösung von adsorbierten Barbituraten traten oft Peaks auf, die von zurückließenden Injektionen stammten, wodurch keine klaren und eindeutigen Gaschromatogramme erhalten werden konnten.

Um die Adsorption bei der gaschromatographischen Analyse der polaren Barbiturate zu verringern, sind Nachweismethoden mit weniger polaren Derivaten dieser Verbindungen entwickelt worden. Über Verfahren mit Abänderung von Barbituraten in Äthyl- (29) Trimethylsilyl- (22,48,49) und Methylderivate (3,11,12,16, 17,22,25,27,33,36,46,47) wurde in der Literatur berichtet.

Wir haben zunächst eine Modifikation der von Mc Gee (29) in seiner Arbeit über gaschromatographischen Nachweis von Barbituraten und Glutethimid im Blut beschriebenen Äthylierungsmethode versucht. Der Autor hat als Derivatisierungsreagens 40 % Tetraäthylammoniumhydroxid in wässriger Lösung angewandt. Es wurde über wesentlich verminderte Adsorption der Alkylderivate berichtet und ein Gaschromatogramm mit 6 klar getrennten, schmalen und symmetrischen Peaks von 5 äthylierten Barbituraten und äthyliertem Glutethimid dargestellt. Mc Gee betonte, daß im Gegensatz zu den Methylierungsmethoden in seinem System Methylphenobarbital und Phenobarbital getrennt werden könnten. Weitere Vorteile seiner Methode gegenüber den meisten Methylierungsverfahren wären die geringere Anzahl an Nebenpeaks und die Schnelligkeit, weil kein extra Arbeitsschritt für die Derivatbildung notwendig wäre, da diese spontan auf der Säule erfolgen würde.

Bei der Gaschromatographie der 26 äthylierten Barbiturate zeigte sich auch bei unseren Versuchen der Vorteil des Arbeitens mit derivatisierten, gering polaren Verbindungen in der deutlich verminderten Adsorption. Obgleich uns die speziellen

Glaskörner, die Mc Gee zur weiteren Verringerung der Adsorption als Trägermaterial für die stationäre Phase benützte, nicht zur Verfügung standen und wir mit dem gewöhnlichem Säulenfüllungsmaterial, SE-30 auf Chromosob G, arbeiteten, waren die nachteiligen Folgen der Adsorption, die bei unseren Versuchen mit nicht derivatisierten Barbituraten aufgetreten waren, nun nicht mehr zu beobachten.

Es tauchten jedoch bei dieser Äthylierungsmethode andere Schwierigkeiten auf. Eine ganze Reihe von Barbituraten, insgesamt neun von den 26 untersuchten, traten nämlich als Doppelpeaks auf. Methylphenobarbital und Phenobarbital zeigten darüber hinaus noch einen weiteren Peak. Trotz Versuchen mit zahlreichen verschiedenen Kombinationen der gaschromatographischen Bedingungen und Anwendung von verschiedenen Säulenfüllungsmaterialien gelang es nicht, die zusätzlichen Peaks zu beseitigen. Es ist anzunehmen, daß sie durch unvollständig äthylierte Derivate hervorgerufen werden und daß die Konzentration der bei uns erhältlichen TEH-Lösung von 25 % zu niedrig ist, um eine vollständige Äthylierungsreaktion zu erreichen. Durch diese Doppelpeaks können aber oft keine eindeutigen Chromatogramme erhalten werden, besonders wenn es gilt, die Anwesenheit von mehreren Barbituraten in einer Probe nachzuweisen. Wir haben uns deshalb noch mit anderen, in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Analyseverfahren für Barbiturate mit Derivatbildung befaßt.

Gaschromatographischer Nachweis von Barbituraten und zahlreichen anderen Substanzen als Trimethylsilylderivate ist durch v. Street (48,49) vorgeschlagen worden. Bei seiner Methode wird das Derivatisierungsreagens, vorzüglich N,O-Bis(trimethylacetamid), und die Arzneistofflösung in die gleiche Mikrospritze aufgezogen und beides zusammen in den Gaschromatographen injiziert. Auch bei dieser Technik erfolgt die Derivatbildung im GC. Der Autor hob vor allem die Einfachheit und Schnelligkeit seiner Methode hervor. Brochmann-Hanssen und Oke (11), die sich intensiv mit Nachweismethoden für Barbiturate beschäftigt haben, berichteten aber, daß bei dem

Silylierungsverfahren nach v. Street die Derivate nicht stabil wären und daß keine konstanten Peakhöhen erreicht werden könnten.

Wir haben deshalb keine Versuche mit Silylierung von Barbituraten durchgeführt, sondern uns nunmehr mit Methylierungsmethoden beschäftigt.

Eine gaschromatographische Nachweismethode für Methylderivate von 11 Barbituraten wurde erstmals von Cook, Riley, Nunn und Budgen (12) beschrieben. Als Derivatisierungsreagens diente Diazomethan in ätherischer Lösung, das im Überschuß auf die Barbituratprobe gegossen wurde. Anschließend ließ man die Methylierungsreaktion über Nacht ablaufen. Von Horning und Mitarbeitern (22) erschien in der neueren Literatur eine Arbeit, in der über Methylierung und anschließende Silylierung bei der gaschromatographischen Analyse von Coffein, Phenobarbital und den Metaboliten dieser Verbindungen berichtet wurde. Dieses Verfahren war wesentlich schneller als das von Cook und Mitarbeitern, weil man die Diazomethanlösung nur 15 Minuten auf die Lösung der Probe einwirken ließ. Die Autoren berichteten über Derivate mit guten gaschromatographischen Eigenschaften.

Wir haben eine Methylierungsmethode mit Diazomethan nicht ausprobiert, weil uns solch ein Analyseverfahren zur routinemäßigen Anwendung wegen des explosiven und hochtoxischen gasförmigen Reagens zu gefährlich erschien.

Eine Nachweismethode für Barbiturate mit Methylierung auf der Säule bei Anwendung von Tetramethylammoniumhydroxid als Derivatisierungsreagens wurde von Stevenson (46) vorgeschlagen. Von 18 untersuchten Barbituraten konnten unter den gewählten gaschromatographischen Bedingungen 13 aufgetrennt werden. Der Autor berichtete, daß die Methylierungsreaktion quantitativ wäre, wenn das Molverhältnis von Tetramethylammoniumhydroxid zum Barbiturat mindestens 4 : 1 betragen würde und die Einspritztemperatur etwa 240° C wäre.

Sowohl v. Street (48) als auch Brochmann-Hanssen und Oke (11) berichteten jedoch, daß sie bei Durchführung der Methode von Stevenson fast bei allen Barbituraten kleine zweite Peaks bekommen hätten. Die beiden letzteren Autoren schlugen ein ähnliches verbessertes Verfahren, mit dem wir uns später eingehend beschäftigt haben, vor.

Zunächst haben wir die gaschromatographische Auftrennung der Barbiturate nach Methylierung mit Dimethylsulfat durchgeführt. Martin und Discoll (33) haben als erste ein solches Verfahren für 4 gebräuchliche Barbiturate beschrieben, wobei die Trennung von 2 von diesen, nämlich Amobarbital und Pentobarbital nicht gelang. Diese beiden Verbindungen konnten mit dem Verfahren von Fiereck und Tietz (16) getrennt werden, die die Methylierungsmethode mit Dimethylsulfat auf 11 Barbiturate und Glutethimid ausdehnten, während Baylis, Fry und Marks eine solche Methode für die als Antikonvulsiva verwendeten Phenobarbital und Diphenylhydantoin ausarbeiteten. Die Vorbereitung der Proben schloß bei all diesen Verfahren neben der eigentlichen Methylierung mit Dimethylsulfat mehrere Extraktions- und Verdampfungsschritte ein und war damit ziemlich zeitraubend und umständlich. Eine einfachere und schnellere Methylierungsmethode wurde von Stewart, Duke und Willcox (47), die die Methylierung direkt in der Testlösung oder im Serum ohne vorherige Extraktion durchführten, beschrieben. Auch die Wissenschaftler, die Dimethylsulfat bei der Vorbereitung der Probe anwandten, berichteten, größere Genauigkeit und verbesserte Chromatogramme durch Derivatisierung der Barbiturate erreicht zu haben.

Wir haben für unsere Experimente über gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten nach Methylierung mit Dimethylsulfat die einfache und schnelle Methode von Stewart und Mitarbeitern (47) gewählt. Wiederum haben wir das Verfahren, das von den Autoren nur für 6 Barbiturate beschrieben worden war, auf die genannten 26 Vertreter dieser Schlafmittel ausgedehnt.

Wie bei unseren Untersuchungen mit Äthylierten Barbituraten waren die Nachteile im Zusammenhang mit der Adsorption, die wir bei nicht derivatisierten Verbindungen beobachtet hatten, jetzt nicht mehr zu erkennen. Unter milden gaschromatographischen Bedingungen erschienen alle 26 Barbiturate innerhalb von 20 Minuten auf dem Chromatogramm. Dabei war die Auftrennung der methylierten Barbiturate innerhalb dieser Zeitspanne wesentlich günstiger als bei den unveränderten Verbindungen, bei denen sich in einem bestimmten Bereich eine Anhäufung von Barbituraten mit gleichen oder ähnlichen Retentionszeiten ergeben hatte. Alle Barbiturate konnten nach Methylierung getrennt werden. Eine Ausnahme bildeten Methylphenobarbital und Phenobarbital, die beide bei Methylierung in 1,3-Dimethylphenobarbital verändert werden und deshalb mit dieser Methode nicht voneinander getrennt werden können. Wie auch in der Literatur erörtert (16,33), spielt dies klinisch keine Rolle, da Methylphenobarbital im Stoffwechsel in Phenobarbital umgewandelt wird.

Diese Alkylierungsmethode mit Dimethylsulfat zeigte bei unseren Untersuchungen aber auch deutliche Nachteile. Eine größere Anzahl von Barbituraten trat nämlich mit einem oder mehreren Nebenpeaks auf. Dadurch war die Auswertung der Gaschromatogramme sehr erschwert. Außerdem erwies sich - trotz Durchführung der vereinfachten Methode von Stewart und Mitarbeitern - die Vorbereitung der Probe als ziemlich zeitraubend. Ferner hielten wir eine solche Nachweismethode wegen der Giftigkeit des Derivatisierungsreagens, Dimethylsulfat, das in einer relativ großen Menge von 0,4 ml gebraucht wurde, zur Routineanwendung nicht besonders geeignet.

Schließlich haben wir die von Brochmann-Hanssen und Oke (11) für Barbiturate, Xantinbasen und phenolische Alkaloide beschriebene gaschromatographische Nachweismethode geprüft. Die Autoren haben wie Stevenson (46) ein Verfahren mit Derivatbildung auf der Säule empfohlen, wobei sie aber Trimethylanilinumhydroxid als Derivatisierungsreagens dem Tetramethylnammoniumhydroxid vorzogen, weil sie der Ansicht waren, daß das

erstere unter milderen Bedingungen und in kürzerer Reaktionszeit thermisch zersetzt würde. Nur bei bromierten und 2-Thio-Barbituraten beobachteten die Autoren Nebenpeaks, die sie auf Zersetzungsprodukte zurückführten. Die Wissenschaftler führten die Vorteile der Derivatisierung bei der Gaschromatographie von Barbituraten aus. Außerdem hoben sie die Schnelligkeit einer Methode mit Derivatbildung auf der Säule hervor. Methylierung mit Trimethylaniliniumhydroxid wurde auch von Kunterberg (27), der eine gaschromatographische Nachweismethode für die als Antiepileptica gebrauchten Phenobarbital, Primidon und Dihydroxydantoin ausarbeitete und von Källberg und Mitarbeitern (25), die ein gaschromatographisches Analyseverfahren für Phenobarbital in kleinen Blutmengen entwickelten, angewandt.

Bei unseren Experimenten hat sich für die gaschromatographische Auftrennung von Barbituraten das Methylierungsverfahren mit Trimethylaniliniumhydroxid nach dem Vorschlag von Brochmann-Hanssen und Oke bei Anwendung auf die 26 genannten Barbiturate als am geeignetsten erwiesen.

Wie bei allen getesteten Derivatisierungsverfahren haben wir auch bei dieser Methode die Folgen der Adsorption, die beim Chromatographieren von nicht derivatisierten, polaren Barbituraten aufgetreten waren, nicht mehr beobachtet. Die auf den Chromatogrammen erscheinenden Peaks waren durchwegs schmal, symmetrisch und frei von Tailings. Es war nicht mehr nötig, das Säulenmaterial durch wiederholte Injektionen mit einem bestimmten Barbiturat zu "sättigen", bevor dieses aufgedeckt werden konnte. Die Peaks zeigten nahezu konstante Höhen. Die Empfindlichkeit war deutlich angewachsen. Alle 26 Barbiturate konnten innerhalb von 25 Minuten unter isothermen Bedingungen aufgedeckt werden. Da die Methylderivate flüchtiger sind als die unveränderten Barbiturate selbst, gelang es, alle Verbindungen bei der relativ niedrigen Säulentemperatur von 165°C gaschromatographisch zu erfassen. Weitere Verbindungen mit langen Retentionszeiten wurden bei 200°C Säulentemperatur chromatographiert und erschienen dann innerhalb von 20 Minuten. Wie bereits bei der Alkylierung von Barbituraten mit Dimethylsulfat erwähnt, zeigten die Methylderivate der Barbiturate, die bei

allen erwähnten Methylierungsmethoden chemisch identisch sind (11,36), eine günstigere Aufteilung innerhalb der genannten Zeitspanne als beim Chromatographieren von unveränderten Barbituraten. Alle wichtigen Verbindungen konnten jetzt eindeutig voneinander getrennt werden.

Ein Vorteil gegenüber dem Methylierungsverfahren mit Dimethylsulfat war die geringere Anzahl an Nebenpeaks bei Anwendung von TMAH; nur die bromierten Barbiturate sowie Methylphenobarbital und Hexobarbital erschienen mit einem zusätzlichen Peak. Diese wenigen Nebenpeaks beeinträchtigen die Klarheit der Gaschromatogramme nicht und können sogar als Hilfe bei der Identifizierung der betreffenden Barbiturate dienen. Ein weiterer Vorteil ist, daß meist eine kleine Menge von etwa 30 µl der TMAH-Lösung, die durch einen Durchstechstutzen aus dem Behälter entnommen werden kann, für die Derivatisierung genügt, während bei Methylierung von Barbituraten mit Dimethylsulfat eine wesentlich größere Menge von etwa 0,4 ml eines toxischen Reagens gebraucht wurde.

Treten Nebenpeaks durch unvollständig derivatisierte Verbindungen auf, so können diese durch Zugabe von Methanol oder TMAH-Lösung entfernt werden. Die Beseitigung von zusätzlichen Peaks war uns bei der Äthylierungsmethode nach Mc Gee (29) nicht gelungen.

Wie auch von Brochmann-Hanssen und Oke (11) hervorgehoben, ist die Methode zeitsparend, weil kein extra Arbeitsvorgang für die Derivatbildung nötig ist - im Gegensatz zu den Alkylierungsverfahren mit Diazomethan und Dimethylsulfat -, weil die Derivatisierung spontan auf der Säule abläuft.

Diese Nachweismethode ist also schnell, einfach, zuverlässig und genügend empfindlich. Sie ermöglicht eine optimale gaschromatographische Auftrennung von 26 Barbituraten und 7 anderen Verbindungen unter milden gaschromatographischen Bedingungen und innerhalb einer zufriedenstellenden Zeit. Bei diesem Verfahren wird kein explosives und keine große Menge eines toxischen Reagens benötigt, so daß es zur routinemäßigen Anwendung geeignet ist.

Extraktionsmethoden

Unsere zweite Aufgabe in dieser Arbeit war, eine einfache, schnelle und routinemäßig anwendbare Extraktionsmethode für Barbiturate aus biologischem Material, die eine gute Ausbeute und genügend saubere Extrakte liefert, so daß klare und eindeutige Gaschromatogramme erhalten werden können, zu finden. Neben unspezifischen Extraktionsmethoden sind in der Literatur eine Reihe von relativ spezifischen Verfahren zur Extraktion von Barbituraten und verwandten Verbindungen, mit denen wir uns näher befaßt haben, erschienen.

Fast ausschließlich wird in der Literatur Extraktion von Barbituraten bei saurem pH, also in ihrer Säureform vorgeschlagen.

Auch wir haben die Barbiturate als Säuren extrahiert, wobei sich - nach zahlreichen Vorversuchen - Ansäuerung der biologischen Probe bis pH 3 als am günstigsten herausgestellt hat.

Die meisten Autoren verwandten Äther oder Chloroform als organisches Lösungsmittel zur Extraktion von Barbituraten. Daneben wurde Extraktion mit Aceton/Äther (1 : 1) (23), Äthylendichlorid und Hexan (27), Toluol (29), Isopropanol (22) sowie Methylendichlorid (50) empfohlen. Leach und Toseland (28) sowie Berry und Grove (4) stellten fest, daß durch Äther Barbituratmetaboliten stärker extrahiert würden als durch Chloroform, und Watson und Kalmann (50) berichteten über vermehrte Extraktion von unbekannten Substanzen durch Äther.

Wir haben vor allem Versuche mit den am häufigsten in der Literatur empfohlenen Extraktionsmitteln, Chloroform und Äther, durchgeführt. Dabei stellte sich auch bei unseren Experimenten der Vorzug von Chloroform gegenüber Äther heraus. Unter gleichen Versuchsbedingungen beobachteten wir das Auftreten von Interfering-Peaks durch unbekannte Substanzen bei

Extraktion mit Äther und Fehlen von solchen bei Anwendung von Chloroform. Außerdem war die Ausbeute der Barbiturate bei Extraktion mit Chloroform besser als bei Gebrauch von Äther. Deshalb haben wir für unsere Extraktionsmethode, mit der wir saubere Extrakte und eine gute Ausbeute der Barbiturate erhalten wollten, Chloroform als Lösungsmittel gewählt.

Anders (1), Jain, Fontan und Kirk (23) sowie Källberg, Agurell, Jalling und Boréus (25) beschrieben je eine Extraktionsmethode für Barbiturate mit Gebrauch von nur Mikrolitermengen an biologischem Material und Extraktionsmittel. Die Autoren betonten die Schnelligkeit eines solchen Mikroverfahrens, da keine langwierigen Reinigungsschritte nötig wären und die Verdampfung des Lösungsmittels nur wenig Zeit in Anspruch nähme.

Da auch unser Ziel war, eine einfache und schnelle Extraktionsmethode für Barbiturate zu finden, haben wir zunächst Versuchsreihen mit Mikrolitermengen an Lösungsmittel durchgeführt, wobei wir alle Kombinationen von 50-250 μ l Chloroform und 2-10 ml Urin ausprobiert haben. Dabei stellte sich heraus, daß in jedem Fall die Barbituratausbeute zu niedrig war, um auch bei leichteren Vergiftungsfällen deutliche gaschromatographische Erscheinungsbilder zu bekommen. Bei Anwesenheit der Barbiturate, Barbital und Phenobarbital mit einer Gesamtkonzentration von 5,96 mg % (UV-spektrophotometrisch bestimmt) in dem untersuchten Urin konnte bei maximaler Empfindlichkeit des Gaschromatographen mit dieser Mikromethode lediglich ein kleiner Barbitalpeak auf dem Chromatogramm entdeckt werden, und Phenobarbital war überhaupt nicht nachzuweisen.

Um eine bessere Ausbeute der Barbiturate zu erreichen, haben wir die Menge des Lösungsmittel erhöht und zunächst verschiedene Extraktionsmethoden mit Anwendung von 5 ml Chloroform sowie 5 ml Blut oder Urin durchgeführt. Es zeigte sich bei

unsere Experimenten, daß bei Extraktion mit der größeren Chloroformmenge von 5 ml nicht nur Barbiturate, sondern auch andere in der biologischen Probe anwesenden Substanzen stärker extrahiert wurden, die Interfering-Peaks auf den Chromatogrammen hervorriefen. Reinigung des Chloroformextraktes war deshalb nötig.

Die meisten Autoren haben in die Vorbereitung der biologischen Probe zur gaschromatographischen Barbituratanalyse einen oder mehrere Reinigungsschritte eingeschlossen. Ausschüttelung des Extraktes mit Phosphatpuffer, pH 7,4 (17), pH 7,2 (27) oder pH 6,5 (28) oder auch mit Natriumdihydrogenphosphat in gesättigter Lösung (33,50), als 4 Mol (25) oder als 0,75 Mol (19) Lösung wurde vorgeschlagen. Berry und Grove (4) griffen die Idee von Frahm und Mitarbeitern (18), die Reinigung von Ätherextrakten mit 5 % Bleiacetatlösung bei einem dünn-schichtchromatographischen Nachweisverfahren für Barbiturate durchgeführt hatten, auf. Sie schüttelten Chloroform-extrakte mit 5 % Bleiacetatlösung aus und untersuchten dann gas- und dünn-schichtchromatographisch auf Barbiturate und andere Substanzen. Die Autoren berichteten, besonders saubere Extrakte bekommen zu haben. In der neueren Literatur ist von Horning und Mitarbeitern (22) eine Arbeit erschienen, in der eine schnelle Extraktionsmethode mit Vermeidung von Emulsionsbildung und guter Ausbeute beschrieben worden ist. Die Autoren extrahierten Phenobarbital und Coffein sowie die Metaboliten von diesen Verbindungen aus verdünntem Plasma, das mit Kaliumcarbonat gesättigt worden war, mit einer kleinen Menge Isopropanol.

Zur Beseitigung von neutralen und basischen Substanzen wurde von mehreren Autoren eine Rückextraktionstechnik bei der Vorbereitung der biologischen Probe zur gaschromatographischen Analyse von Barbituraten vorgeschlagen. Dabei wurden die Barbiturate z.B. in wässrige Lösungen von NaOH (8,17,28,41) oder Na_3PO_4 (27) übergeführt und nach Ansäuern der Probe in ein organisches Lösungsmittel zurückextrahiert.

Die auf diese Weise eine ganz einfache Extraktionsmethode klar und dabei Reinigung des Extraktes mit Phosphatpuffer, wie es in der Literatur an mehreren Stellen empfohlen worden ist, (17, 27, 28), angewandt. 5 ml Blut oder Urin wurden mit 5 ml Chloroform extrahiert und der Extrakt wurde dann mit zwei 5 ml Portionen Phosphatpuffer, pH 7,4, durch Ausschütteln gereinigt. Die Einschaltung der Reinigungsschritte war wieder mit Verlust verbunden, der aber nur geringfügig war. Im allgemeinen bekamen wir genügend saubere Extrakte. Nur bei Anwesenheit von großen Mengen anderer Arzneistoffe im Blut oder Urin und bei biologischen Proben von in Fäulnis übergegangenen Leichen reichte die zweimalige Reinigung mit Phosphatpuffer oft nicht aus. Um auch in solchen Fällen genügend saubere Extrakte zu bekommen, haben wir uns mit Rückextraktionsmethoden beschäftigt.

Wir haben zuerst folgende Rückextraktionstechnik an zahlreichen Blut- und Urinproben durchgeführt: Nach Extraktion von 5 ml der biologischen Probe mit 5 ml Chloroform und Waschen des Chloroformextraktes mit zwei 5 ml Portionen Phosphatpuffer, pH 7,4, - wie vorher - wurden die Barbiturate in 5 ml gesättigte Na_2CO_3 -Lösung durch Ausschütteln übergeführt. Es folgte Reinigung der wässrigen Phase mit zwei 5 ml Portionen Chloroform. Nach Ansäuern der Probe wurde wiederum mit 5 ml Chloroform extrahiert. Auch dieser letzte Chloroformextrakt wurde zwei Mal mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen. Wir erhielten mit dieser Extraktionsmethode bei allen untersuchten Blut- und Urinproben genügend saubere Extrakte. Die Ausbeute der Barbiturate war jedoch gegenüber dem Verfahren ohne Rückextraktion deutlich reduziert. Vor allem aber erschien uns diese Methode zu zeitraubend. Um diese Nachteile zu beseitigen, haben wir dieses Rückextraktionsverfahren insoweit verändert, als wir die Zahl der Reinigungsschritte reduziert und die Chloroformmenge auf je 50 ml erhöht haben.

Das nunmehr durchgeführte Extraktionsverfahren für Barbiturate aus biologischen Proben wurde auch von Bogan und Smith (6) empfohlen. 5 ml Blut oder Urin wurden mit 50 ml Chloroform ausgeschüttelt und der Extrakt wurde dann ein Mal mit 5 ml

Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Die Barbiturate wurden danach in 5 ml NaOH-Lösung durch Ausschütteln übergeführt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase erfolgte Rückschüttelung mit 50 ml Chloroform. Wir erreichten mit dieser Extraktionsmethode nicht nur zufriedenstellend reine Extrakte, sondern auch eine sehr gute Ausbeute der Barbiturate. Trotz Reduzierung der Arbeitsschritte schien uns dieses Verfahren immer noch zu langwierig, und wir haben zuletzt eine ganz einfache Methode ohne Rückextraktion versucht.

Die folgende Methode hat sich für die Extraktion von Barbituraten aus Blut- und Urinproben als am geeignetsten erwiesen: 5 ml der biologischen Probe werden mit 50 ml Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird danach mit 5 ml 5 % Bleiacetatlösung durch Ausschütteln gereinigt.

Dieses Extraktionsverfahren erfordert nur wenige unkomplizierte Arbeitsschritte und ist deshalb schnell, einfach und zur routinemäßigen Anwendung geeignet. Liegt ein mittlerer oder höherer Barbituratgehalt vor, so genügen 1-5 ml Chloroform zur Extraktion, was die Schnelligkeit der Methode noch erhöht.

Durch Reinigung des Chloroformextraktes mit 5 % Bleiacetatlösung - wie auch von Berry und Grove (4) vorgeschlagen - erreichten wir genügend saubere Extrakte, so daß sich mehrfaches Waschen und Rückextraktionstechniken erübrigten. Nur wenige andere Arzneistoffe und körpereigene Substanzen, die später diskutiert werden sollen, werden bei dieser Methode mit extrahiert und gaschromatographisch erfaßt.

Durch die relativ große Menge an Extraktionsflüssigkeit und die Reduzierung auf einen einzigen Reinigungsschritt wird eine sehr gute Ausbeute der Barbiturate erhalten.

Eine Konzentrierung der Barbituratlösung wurde von vielen Autoren durch Eindampfen des letzten Extraktes und Wiederauflösung des Rückstandes in einer kleinen Menge eines geeigneten Lösungsmittels erreicht. Bei Bildung von Derivaten der Barbiturate mit Tetraäthylammoniumhydroxid, Tetramethyl-

ammoniumhydroxid und Trimethylanilinhydroxid war die Lösung des Derivatisierungsreagens zugleich das letzte Lösungsmittel.

Auch wir haben bei allen durchgeführten Extraktionsmethoden zuletzt das organische Lösungsmittel eingedampft. Der Rückstand wurde stets in etwa 30 µl TMAH-Lösung aufgenommen, da wir bei allen Versuchen über Extraktion der Barbiturate aus biologischem Material die anschließende Gaschromatographie nach Methylierung der Probe mit TMAH ausgeführt haben.

Die dargestellte Extraktionsmethode ist somit schnell, einfach und zur routinemäßigen Anwendung geeignet. Sie ist spezifisch und bewirkt eine gute Ausbeute der Barbiturate. Die Klarheit und Eindeutigkeit der Ergebnisse unser Extraktions- und gaschromatographischen Methode wird durch die in den Abbildungen 1-13 dargestellten Gaschromatogramme von Extrakten aus Blut- und Urinproben veranschaulicht.

Kombination von Dünnschicht- und Gaschromatographie

Bei der Vorbereitung von Proben aus Mageninhalten zur gaschromatographischen Barbituratanalyse bekamen wir mit unserer Extraktionsmethode, die sich für Blut- und Urinproben als optimal erwiesen hat, und auch mit den beschriebenen vorher ausprobierten Verfahren in manchen Fällen keine genügend sauberen Extrakte. Besonders bei Proben aus Mageninhalten von in Fäulnis übergegangenen Leichen reichten die bis dahin durchgeführten Reinigungsmethoden nicht aus. Auf den Gaschromatogrammen erschienen breite und unförmige Interfering-Peaks, die keine klaren Ergebnisse zuließen. Verun-

reinigung der Säule durch die unsauberen Extrakte beeinträchtigte in kurzer Zeit ihre Wirksamkeit. Wir haben uns deshalb noch mit anderen Extraktionsmethoden für Barbiturate, die in der Literatur beschrieben sind, beschäftigt.

Da sich eiweißfreie Flüssigkeiten besser extrahieren lassen, führten wir Verfahren durch, die zur Enteiweißung von Körperflüssigkeiten, Organteilen oder Mageninhalten empfohlen worden sind. Die von den Autoren vorgeschlagenen verschiedenen Variationen der Eiweißpräzipitation mit Natriumwolframatlösung (15,30,31,32,48,49) oder auch weinsaurem Alkohol oder Aceton (30) wurden getestet. Aber auch mit diesen Eiweißfällungsmethoden bekamen wir bei Anwendung auf Proben aus Mageninhalten in manchen Fällen keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Um reinere Extrakte aus Mageninhalten zu erhalten, haben wir deshalb in die Vorbereitung der Probe ein dünn-schichtchromatographisches Trennungsverfahren mit einbezogen. Folgendes Vorgehen hat sich nach zahlreichen Experimenten als am geeignetsten erwiesen: Die Probe aus Mageninhalt wird zunächst nach der Methode von Valov (49+), einer Eiweißfällungsmethode mit Natriumwolframatlösung aufgearbeitet. Nach Verdampfen des Äthers am Ende des Verfahrens wird der Rückstand in einer kleinen Menge Äthanol aufgenommen. Diese Lösung wird einer dünn-schichtchromatographischen Methode, die von Komm (26+) zum Nachweis eines breiten Bereichs von insgesamt 28 Barbituraten ausgearbeitet worden ist, unterworfen. Als Fließmittel dient dabei Diäthyläther, Aceton, Dioxan, Ammoniak (30 : 30 : 30 : 10). Das barbiturathaltige Kieselgel wird am Ende des Verfahrens von der Platte abgekratzt und mit Aceton extrahiert. Nach Eindampfen des Acetons wird der Rückstand in etwa 30 µl TMAH-Lösung aufgenommen. Etwa 1 µl dieser Lösung wird nunmehr gaschromatographiert.

Die auf diese Weise erhaltenen Gaschromatogramme waren sehr klar und eindeutig, wie aus den Abbildungen 10 B, 11 A und 13 A zu ersehen ist. Bei Anwendung dieser Methode auf zahlreiche praktische Fälle haben wir nur ein einziges Mal einen Störpeak, hervorgerufen durch Palmitinsäure, beobachtet. Die Probe stammte aus dem Mageninhalt einer einige Monate alten Leiche. Das zugehörige Gaschromatogramm ist in Abb. 12 dargestellt. Für die zuverlässigen Ergebnisse nahmen wir den etwas größeren Zeitaufwand dieser Nachweismethode in Kauf.

Durch Einschaltung einer geeigneten dünnschichtchromatographischen Technik in die Vorbereitung der biologischen Probe ist die einwandfreie gaschromatographische Barbituratanalyse in Mageninhalten gelungen.

Andere Arzneistoffe, die mit extrahiert und gaschromatographisch erfaßt werden

Von mehreren Autoren wurde beobachtet, daß auch bei relativ spezifischen gaschromatographischen Nachweismethoden für Barbiturate andere Substanzen mit extrahiert werden und auf den Gaschromatogrammen erscheinen können (3,28,32,37,47,48,50). Auch bei Anwendung unserer Methode der Extraktion von Barbituraten aus Körperflüssigkeiten traten unter den dargestellten gaschromatographischen Bedingungen und bei Methylierung der Probe mit TMAH andere saure, aber auch neutrale und basische Substanzen auf. Diese Arzneistoffe, die häufig zusammen mit Barbituraten gebraucht werden, wurden in unsere Nachweismethode mit eingeschlossen.

Folgende Nichtbarbiturate wurden mit untersucht:

Meprobamat, Methyprylon, Coffein, Glutethimid, Primidon, Methaqualon und Diphenylhydantoin.

Diese Verbindungen interferierten nicht mit den untersuchten Barbituraten. Nur Coffein und Hexobarbital zeigten die gleiche

Retentionszeit, wenn bei einer Säulentemperatur von 200° C chromatographiert wurde. Alle diese Substanzen erschienen mit einzelnen Peaks. Nur Methypylon zeigte nach Methylierung mit TMAH 3 Peaks, wobei der zweite und dritte dieser Peaks sich in seiner Retentionszeit bei der Testlösung und der biologischen Probe gering unterschied, was durch Vergleich der in Abbildung 6 A und 6 B gezeigten Gaschromatogramme zu ersehen ist. Wir nehmen an, daß chemisch ähnliche Metaboliten gebildet werden, die zu der Veränderung der Retentionszeiten führen. Der Hauptpeak von Methypylon fiel mit dem Peak von Meprobamat zusammen. Kommen beide Verbindungen zusammen vor, so ist deshalb eine sichere Identifizierung von Meprobamat mit unserer Nachweismethode nicht möglich. Das Gaschromatogramm eines solchen Falles ist in Abbildung 1 A dargestellt. Coffein fand sich häufig auf den Gaschromatogrammen. Einige von diesen sind in den Abbildungen 4 A und B, 8 und 9 gezeigt. Es ist zu sehen, daß der Peak von Coffein ein leichtes Front-tailing aufweist. Wie viele Autoren (2,15,16,28,29,41,48) haben auch wir Glutethimid in unsere Nachweismethode für Barbiturate eingeschlossen, da es in der sauren Fraktion erscheint und häufig zusammen mit Barbituraten vorkommt. Gaschromatogramme mit Glutethimid sind in den Abbildungen 1 A und B sowie 7 dargestellt. Primidon, das chemisch dem Phenobarbital nahesteht und im Körper zu diesem oxydiert wird - wie in der Literatur beschrieben (4,48) - haben wir ebenfalls mit untersucht. Methaqualon wird bei unserem Verfahren nicht besonders gut extrahiert, und es kann nur aufgedeckt werden, wenn es in größerer Menge in der biologischen Probe anwesend ist. Wie die Gaschromatogramme der Abbildungen 1 B und 9 zeigen, konnte Methaqualon in diesen Fällen nachgewiesen werden. Es fehlt jedoch auf dem Gaschromatogramm der Abbildung 11, wo es ebenfalls in der biologischen Probe vorhanden war, aber in einer zu geringen Konzentration. Diphenylhydantoin kommt häufig zusammen mit anderen Antikonvulsiva, vor allem Phenobarbital und Primidon, vor. Es ist auf dem Gaschromatogramm der Abbildung 1 B zusammen mit Phenobarbital und anderen Verbindungen dargestellt. Substanzen mit längerer Retentionszeit - Coffein, Glutethimid, Primidon, Methaqualon und

Diphenylhydantoin - werden schneller bei einer Säulentemperatur von 200°C gaschromatographisch aufgedeckt. Dies wird durch die Gaschromatogramme der Abbildung 1 B, 4 A und B sowie 9 verdeutlicht.

Bei Anwesenheit eines Barbituratmetaboliten, der einen Äthylsubstituenten trägt, kann ein Peak auftreten, der dem Barbital entspricht. Dies wird durch die Gaschromatogramme der Abbildungen 11 A und B sowie 13 A und B veranschaulicht. Wie die Abbildungen 11 A und 13 A zeigen, wurde im Magen jeweils Pentobarbital, die 5 Äthyl-5- (1 methvlbutyl)-Barbitursäure, gefunden. Aus den Abbildungen 11 B und 13 B ist zu ersehen, daß der entsprechende Urinextrakt jeweils einen deutlichen Barbitalpeak auf dem Gaschromatogramm hervorbrachte. Ähnliche Beobachtungen haben auch Leach und Toseland (28) gemacht. Sie führten aus, daß mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich Barbital als Abbauprodukt des Äthylsubstituierten Barbiturates auftritt.

Interfering-Peaks durch körpereigene Substanzen

Bei der gaschromatographischen Analyse von Barbituraten in biologischem Material können Interfering-Peaks durch körpereigene Substanzen auf den Chromatogrammen erscheinen. In der Literatur ist über dieses Problem noch wenig berichtet worden. Niyogi und Rieders (37) haben allgemein die Fähigkeit von 24 endogenen Verbindungen, bei gaschromatographischen Analysen von Arzneistoffen bei direkter Chloroformextraktion aus forensischen Blutproben Interfering-Peaks hervorzubringen, untersucht und eine Arbeit darüber veröffentlicht. Horning und Mitarbeiter (22) beschrieben eine gaschromatographische

Nachweismethode für Phenobarbital, Coffein und die Metaboliten von diesen Verbindungen im Plasma und stellten Interfering-Peaks durch höhere Fettsäuren fest. Die Autoren erklärten, daß diese durch zweimaliges Waschen mit Isooctan beseitigt werden könnten, ohne daß die Menge der Arzneistoffe dadurch wesentlich verändert würde.

Auch bei Anwendung unserer gaschromatographischen Nachweismethode an zahlreichen Blut- und Urinproben begegneten wir regelmäßig Interfering-Peaks mit konstanten Retentionszeiten. Da diese auch auf dem Gaschromatogramm eines Testserums zu finden waren, von dem wir wußten, daß nur 7 Arzneistoffe zugesetzt worden waren, schlossen wir, daß die Interfering-Peaks durch körpereigene Substanzen hervorgerufen werden.

Um diese endogenen Verbindungen zu identifizieren, haben wir 18 natürlich vorkommende Substanzen untersucht, wobei als Richtschnur die Arbeit von Niyogi und Rieders (37) diente. Die von diesen Autoren aufgeführten, direkt mit Chloroform extrahierbaren Verbindungen aus der sauren und neutralen Gruppe wurden in unsere Experimente einbezogen. Außerdem untersuchten wir noch einige andere wichtige Bestandteile von Körperflüssigkeiten. Aus dieser zuletzt genannten Gruppe erschienen 3 Verbindungen mit Peaks, die mit den Interfering-Peaks, die regelmäßig auf den Gaschromatogrammen von biologischen Probenextrakten aufgetreten sind, übereinstimmten. Es sind die höheren Fettsäuren, Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure, wobei die Retentionszeiten mit zunehmender Zahl an Kohlenstoffatomen zunehmen. Horning und Mitarbeiter (38) fanden in ihrem gaschromatographischen System Interfering-Peaks durch die Fettsäuren, Palmitin-Stearin-Öl- und Linolensäure, während wir solche durch niedriger molekulare Fettsäuren entdeckten. Gelegentlich trat noch ein zusätzlicher Peak beim Chromatographieren von biologischen Probenextrakten auf, der nicht identifiziert werden konnte. Er wurde stets zusammen mit Palmitinsäure beobachtet. Ein Beispiel dafür ist das Gaschromatogramm der Abbildung 8.

Laurinsäure und Aprobarbital haben die gleiche Retentionszeit und die von Myristinsäure und Methohexital sowie Palmitinsäure und Heptabarbital liegen nahe beisammen. Der Gaschromatographische Nachweis der genannten Barbiturate war damit sehr in Frage gestellt. Eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und gaschromatographisch gleichen oder ähnlichen körperfremden Substanzen konnte durch Abänderung des Extraktionsverfahrens erreicht werden. Es zeigte sich nämlich, daß bei Reduzierung der Chloroformmenge von 50 ml auf 5 ml die genannten Fettsäuren sehr schlecht extrahiert werden und keine Interfering-Peaks mehr hervorrufen können. Die Ausbeute der Arzneistoffe nimmt dagegen unter diesen Bedingungen nur wenig ab. Unter 7 untersuchten Barbituraten und anderen Sedativa wurde nur bei Phenobarbital eine etwas deutlichere Abnahme der Ausbeute verzeichnet. Für die in Abbildung 4 A und B, 8 sowie 9 dargestellten Gaschromatogramme wurde die Extraktion mit 50 ml Chloroform durchgeführt. Es ist zu sehen, daß auf allen Gaschromatogrammen Peaks durch die Fettsäuren, Myristinsäure und Palmitinsäure, aufgetreten sind. Für die übrigen Darstellungen, die keine Interfering-Peaks zeigen, wurde die Extraktion mit einer Menge von 5 ml oder weniger Chloroform ausgeführt. Unsere Experimente ergaben, daß bei einem Arzneistoffgehalt von 2 mg % oder mehr, 1-5 ml Chloroform zur Extraktion genügen, um deutliche Gaschromatogramme zu erhalten. Diese sind bei einer solchen Chloroformmenge frei von Interfering-Peaks.

Nach dünn-schichtchromatographischer Reinigung wurden, wie zu erwarten, keine Interfering-Peaks durch körpereigene Substanzen festgestellt.

Identifizierung

Von den meisten Autoren wurde die Identifizierung von Barbituraten bei der Gaschromatographie mit Hilfe der Retentionszeiten bzw. relativen Retentionszeiten vorgenommen. An mehreren

Stellen wird in der Literatur darauf hingewiesen, daß die Identität eines Barbiturates durch einen weiteren Parameter erhärtet werden muß. Die Probe kann auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität chromatographiert werden (13,41,50). Es wurde auch empfohlen, nacheinander zwei unterschiedlich derivatisierte Proben (49) oder die unveränderte und dann die derivatisierte Probe (11,48,49) zu chromatographieren. Ferner wurde Kombination von Gaschromatographie mit anderen analytischen Methoden zur Sicherung der Identifizierung von Barbituraten vorgeschlagen. Als dafür geeignete Verfahren wurden UV-Spektrophotometrie (6,40), Dünnschichtchromatographie (2,4,6,22,30), Infrarotspektrophotometrie (8,17,48) und Massenspektrometrie (17,22) angesehen.

Auch wir haben die Identifizierung der Barbiturate und einiger anderer Substanzen mit Hilfe der Retentionszeiten durchgeführt. Diese wurden für die untersuchten 26 Barbiturate und 7 anderen Verbindungen an Hand von Testlösungen ermittelt. Da sich die Retentionszeiten im Laufe der Zeit etwas verändern können, haben wir täglich eine Kontrolllösung mit Phenobarbital in den Gaschromatographen injiziert und eine Abweichung der Retentionszeit durch Temperaturveränderung ausgeglichen, so daß der ursprüngliche Wert wieder erhalten wurde. Nach jeder Analyse wurde außerdem eine Kontrolllösung der Reinsubstanz der gefundenen Verbindung in den GC injiziert und die Retentionszeiten miteinander verglichen. Zur Erhärtung der Identifizierung wählten wir das Chromatographieren der Probe mit und ohne Derivatisierung. Dieses Vorgehen erschien uns am einfachsten und war nicht weniger zuverlässig als die anderen in der Literatur angegebenen Möglichkeiten ohne Einbeziehung einer anderen analytischen Methode. Die Gaschromatogramme der Abbildungen 5 A, B, C und D sowie 6 A, B, C und D veranschaulichen, daß die Veränderung der Retentionszeit der gesuchten Substanz im biologischen Extrakt durch die Methylierung bei Vergleich mit den entsprechenden Kontrolllösungen zur sicheren Identifizierung verwendet werden kann. Zur weiteren Erhärtung der Identifizierung hat sich die dünnschichtchromatographische Methode von Komm (26+) bewährt. Dieses Trennungsverfahren ist

besonders in Kombination mit unserer gaschromatographischen Nachweismethode geeignet, weil es wie diese einen breiten Bereich von Barbituraten einschließt. Auf diese Weise war eine sichere Identifizierung möglich.

Quantitative Bestimmung

Von mehreren Autoren wurde nicht nur die Identifizierung, sondern auch die quantitative Bestimmung von Barbituraten mit Gaschromatographie vorgenommen. Es sind Arbeiten über quantitative Analyse von unveränderten (1,7,15,19,20,30,45,49,50) und derivatisierten (3,11,16,25,27,29,33,47) Barbituraten veröffentlicht worden. Verschiedene Wissenschaftler haben ausgeführt, daß infolge der Adsorption der Barbiturate an das Trägermaterial der Säule quantitative Bestimmung trotz Spezialtechniken der Säulenvorbehandlung und Sättigung der Säule mit einem bestimmten Barbiturat schwierig oder unmöglich sei (11,16,27,33,47). Aber auch bei Derivatisierung der Barbiturate wurde über Schwierigkeiten bei Versuchen mit quantitativer Bestimmung berichtet. V. Street (49) erörterte, daß bei Methylierung der Barbiturate mit Trimethylanilinumhydroxid die Peakhöhen nicht konstant wären. Ebenso fand der Autor bei Trimethylsilylderivaten keine konstanten Peakhöhen. V. Street (49) hat quantitative Bestimmung mit nicht derivatisierten Arzneistoffen bei Anwendung einer ausgedehnten Spezialtechnik der Säulenvorbehandlung und qualitative Analyse nach Derivatisierung empfohlen. Andererseits haben Brochmann-Hanssen und Oke (11) und anderen Autoren (25,27), die Methylierung der Barbiturate mit TMAH durchführten, nicht nur die qualitative, sondern auch die quantitative Bestimmung mit

den Derivaten vorgenommen. Von einigen Autoren wurde vorgeschlagen, zur Identifizierung von Barbituraten Gaschromatographie, zur quantitativen Bestimmung aber eine andere analytische Methode z.B. UV-Spektrophotometrie anzuwenden (6,32).

Wir haben von Experimenten mit nicht derivatisierten Barbituraten zur quantitativen Bestimmung abgesehen, weil wir bei unseren Untersuchungen mit unveränderten Barbituraten trotz Anwendung von verbesserten Säulenfüllungsmaterialien deutliche Adsorption dieser polaren Verbindungen beobachtet haben und wir deshalb nur ungenaue quantitative Ergebnisse erwarten konnten. Wir haben jedoch Versuche über quantitative Bestimmung von Barbituraten nach Methylierung mit TMAH durchgeführt. Als internen Standard wählten wir Methohexital, weil es unter den untersuchten Barbituraten auf dem Gaschromatogramm ziemlich zentral lag. Es zeigte sich nun, daß das Peakhöhenverhältnis zwischen dem zu bestimmenden Barbiturat und dem internen Standard bei einer bestimmten Konzentration nahezu konstant war. Die Werte der Peakhöhenverhältnisse bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen wichen jedoch deutlich von einer Geraden ab. Wir bekamen also kein lineares Verhältnis. Aus diesem Grund war eine genaue quantitative Analyse nicht gewährleistet. Wir glauben, daß das UV-spektrophotometrische Verfahren nach Goldbaum (184) zur quantitativen Bestimmung von Barbituraten geeignet ist. Diese Methode kann gleichzeitig dazu dienen, die Anwesenheit der Barbiturate in der biologischen Probe zu erhärten.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde eine einfache, schnelle, zuverlässige und genügend empfindliche gaschromatographische Nachweismethode für einen breiten Bereich von Barbituraten entwickelt, die zur routinemäßigen Anwendung im chemisch-toxikologischen Labor geeignet ist.

Dazu haben wir zunächst ein gaschromatographisches System erarbeitet, daß eine optimale Auftrennung von 26 Barbituraten und 7 anderen Verbindungen, die häufig zusammen mit Barbituraten gebraucht werden, aus Lösungen der Reinsubstanzen erlaubt. Die Arzneistoffe werden mit dem basischen Reagens, Trimethylanilinumhydroxid, in Methylderivate verwandelt. Die gaschromatographische Trennung erfolgt auf einer Säule mit OV-1 als stationäre Phase bei einer Säulentemperatur von 165° C. Zur schnellen Aufdeckung von Verbindungen mit langen Retentionszeiten wird eine Temperatur von 200° C gewählt.

Weiterhin fanden wir zum Nachweis von Barbituraten in biologischem Material eine einfache und schnelle Extraktionsmethode, die eine gute Barbituratausbeute ermöglicht und genügend saubere Lösungen zur gaschromatographischen Analyse liefert. Die Extraktion wird bei saurem pH mit Chloroform ausgeführt. Ein einziger Reinigungsschritt, nämlich Waschung mit 5 % Bleiacetatlösung, ist in die Vorbereitung der biologischen Probe eingeschlossen. Zum Nachweis von Barbituraten in Mageninhalt wird eine dünnschichtchromatographische Auftrennung vor der gaschromatographischen Identifizierung durchgeführt.

Den Interfering-Peaks, die in diesem gaschromatographischen System erscheinen, haben wir besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Es stellte sich heraus, daß sie durch bestimmte

höhere Fettsäuren, die in Körperflüssigkeiten vorkommen, hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit zur Beseitigung dieser Interfering-Peaks durch Veränderung des Chloroformvolumens bei der Extraktion wurde beschrieben.

Die Identifizierung der Barbiturate wurde mit Hilfe der Retentionszeiten vorgenommen. Durch Chromatographieren der Probe mit und ohne Derivatisierung und Vergleich der Retentionszeiten wird die Identifizierung gesichert. Zur weiteren Erhärtung der Identität eines Barbiturates wählten wir die Kombination unserer gaschromatographischen Methode mit dem dünn-schichtchromatographischen Verfahren von Komm (26+).

Unsere Nachweismethode für Barbiturate hat sich bereits im täglichen Laborbetrieb praktisch bewährt.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) M.W. Anders
Anal. Chem.
Vol. 38, No. 13, 1966
- (2) H.J. Battista
und G. Machata
Chromatographia 1
1968
- (3) E.M. Baylis, D.F. Fry
und V. Marks
Clin. Chim. Acta
Vol. 30, 1970
- (4) D.J. Berry und
J. Grove
J. Chromatogr.
Vol. 61, 1971
- (5) D.J. Blackmore und
R. W. Jenkins
J. Forensic, Sci. Soc.
Vol. 8, No. 1, 1968
- (6) J. Bogan und
H. Smith
J. Pharm. Pharmac.
Vol. 20, 1968
- (7) L. J. Braddock und
N. Marec
J. Gas Chromatogr.
Vol. 3, 1965

- (17) B.S. Finkle, E. J. Cherry
und D. M. Talor J. Chromatogr. Sci.
Vol. 9, 1971
- (18) V. M. Frahm, A. Gottesleben,
K. Soehring Pharm. Acta Helv.
Vol. 38, 1963
- (18+) L. R. Goldbaum Anal. Chem. Vol. 24, 1952
- (19) G.A. Grieve und
R. C. Hatsch Am. J. Vet. Res.
Vol. 33, No. 1, 1972
- (20) R. C. Hatsch Am. J. Vet. Res.
Vol. 33, No. 1, 1972
- (21) Vanden Heuvel,
C.C. Sweeley und E. C.
Horning J. Amer. Chem.
Soc.
Vol. 82, 1965
- (22) M. G. Horning, E.A. Boucher
M. Stafford und E. C.
Horning Clin. Chim. Acta
Vol. 37, 1972
- (23) N. C. Jain, C.R. Fontan
und P. L. Kirk Microchem. J.
Vol. 8, 1964
- (24) J. Janák Nature
Vol. 185, 1960
- (25) N. Källberg, S. Agurell,
B. Jalling und L.O. Boréus Europ. J.
Clin. Pharmacol.
Vol. 3, 1971

- (26) E.van der Kleijn
G.S. Beelen und
M.A. Frederick Clin. Chim. Acta
Vol. 34, 1971
- (26+) W. Komm Dissertation im Institut für ge-
richtliche und Versicherungsmedizin,
München 1972
- (27) H. J. Kunferberg Clin. Chim. Acta
Vol. 29, 1970
- (28) H. Leach und P.A.
Toseland Clin. Chim. Acta
Vol. 20, 1968
- (29) J. Mac Gee Clin. Chem.
Vol. 17, No. 7, 1971
- (30) G. Machata und
H. J. Battista Microchim. Acta
Vol. 4, 1968
- (31) C. Mc Martin und
H. v. Street J. Chromatogr.
Vol. 22, 1966
- (32) C. Mc Martin und
H. v. Street J. Chromatogr.
Vol. 23, 1966
- (33) H. F. Martin
und J. L. Discoll Anal. Chem.
Vol. 38, No. 2, 1966
- (34) J. C. Van Meter Clin. Chem.
Vol. 17, No. 5, 1971
- (35) D. F. Nelson und
P. L. Kirk Anal. Chem.
Vol. 34, No. 8, 1962

- (36) G. A. Neville
Anal. Chem.
Vol. 42, No. 3, 1970
- (37) S. K. Niyogi
und F. Rieders
Acta pharmacol.
et toxicol.
Vol. 29, 1971
- (38) K. D. Parker,
C. R. Fontan und
P. L. Kirk
Anal. Chem.
Vol. 35, No. 3, 1963
(418-419)
- (39) K. D. Parker
C. R. Fontan und
P. L. Kirk
Anal. Chem.
Vol. 35, No. 3, 1963
(356 - 359)
- (40) K. D. Parker und
P. L. Kirk
Anal. Chem.
Vol. 33, No. 10, 1961
- (41) H. F. Proless und
H. J. Lohmann
Clin. Chem.
Vol. 17, No. 3, 1971
- (42) K. E. Rasmussen,
S. Rasmussen und
A. Baerheim Svendsen
J. Chromatogr.
Vol. 66, 1972

- (43) J. F. Reith,
R. F. van der Heide
und R.F. A. Zwaal Pharm. Weekblad 100,
1965
- (44) F. Rieders Theory and Application of Gas
Chromatography in Industry and
Medicine. H. S. Kromen und
S. R. Bender, Eds. Grune and
Stratton, New York 1968
- (45) J. L. Sibert und
F. L. Fricke J. Assoc. Offic. Agric.
Chem.
Vol. 51, No. 6, 1968
- (46) G. W. Stevenson Anal. Chem.
Vol. 38, No. 13, 1966
- (47) J. T. Stewart,
G. B. Duke und
J. E. Willcox Analytical Letters
2 (8), 1969
- (48) H. v. Street J. Chromatogr.
Vol. 41, 1969
- (49) H. v. Street Clin. Chim. Acta
Vol. 34, 1971
- (49+) Valov Industrial and Engineering
Chemistry Vol. 18, 1946
- (50) E. Watson und
S. M. Kalman Clin. Chim. Acta
Vol. 38, 1972

